

**ONDERZOEK NAAR DE IN-VITRO EN IN-VIVO
GEVOELIGHEID VAN *ESCHERICHIA COLI*
VOOR AMPICILLINE**

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE
AAN DE ERASMUS UNIVERSITEIT ROTTERDAM
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
PROF. DR. J. SPERNA WEILAND
EN VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN.
DE OPENBARE VERDEDIGING ZAL PLAATSVINDEN OP
WOENSDAG 16 SEPTEMBER 1981 DES NAMIDDAGS
TE 2.00 UUR

DOOR

IWAN PETER THONUS

geboren te 's-Gravenhage

1981

BRONDER-OFFSET B.V. — ROTTERDAM

PROMOTOR Prof. Dr M.F. Michel

CO-REFERENTEN Prof. Dr I.L. Bonta
 Prof. Dr R.P. Mouton

voor Peter en Bart

Lijst van veel voorkomende afkortingen en symbolen.

id, od, \emptyset	= inwendige-, uitwendige diameter, diameter
μm , mm, cm	= micro-, milli-, centimeter
μg , mg, g	= micro-, milligram en gram
μl , ml	= micro-, milli-liter
μCi	= microcurie
IU	= internationale eenheid
min	= minuten
CV	= variatie coëfficiënt
SD	= standaard deviatie
iv, im	= intraveneus, intramusculair
$T_{\frac{1}{2}}$	= halfwaarde tijd
OD	= optische dichtheid
CFU	= kolonie-vormende eenheid
NB	= nutriënt-broth (= voedings-bouillon)
DST	= Diagnostic Sensitivity Test-agar
FZ	= fysiologische zoutoplossing
C	= concentratie
MRC	= minimaal remmende concentratie
MAC	= minimale antibioticum concentratie
MEC	= minimaal effectieve concentratie
ko	= groeiconstante
ka	= ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante

INHOUDSOPGAVE

Hoofdstuk I	ALGEMENE INLEIDING	7
Hoofdstuk II	ONTWIKKELING VAN EEN CONTINU INFUUS-SYSTEEM VOOR LANGDURIG GEBRUIK	11
Hoofdstuk III	INTRA-RENALE VERDELING VAN AMPICILLINE IN DE GE- ZONDE EN GEÏNFECTEERDE NIER VAN DE RAT	21
Hoofdstuk IV	ONTWIKKELING VAN EEN INFECTIE- EN THERAPIEMODEL	43
Hoofdstuk V	ONDERZOEK NAAR DE RELATIE TUSSEN DE VIRULENTIE VAN <i>E.COLI</i> EN DE IN VIVO GEVOELIGHEID VAN <i>E.COLI</i> VOOR AMPICILLINE	59
Hoofdstuk VI	VERGELIJKEND ONDERZOEK NAAR DE UITKOMSTEN VAN EEN AANTAL IN VITRO UITGEVOERDE KWANTITATIEVE GEVOELIGHEIDSBEPALINGEN BIJ <i>E.COLI</i>	69
Hoofdstuk VII	ONDERZOEK NAAR DE EIGENSCHAPPEN VAN <i>E.COLI</i> STAM- MEN DIE DE IN VIVO GEVOELIGHEID (MEC) VAN <i>E.COLI</i> VOOR AMPICILLINE BEPALEN	93
	SAMENVATTING	109
	SUMMARY	115
	LITTERATUUR	121
	CURRICULUM VITAE	130

ALGEMENE INLEIDING.

Vraagstelling. Antibiotica worden sinds enkele tientallen jaren op ruime schaal toegepast bij de behandeling van bacteriële infecties. Desondanks is het tot op heden niet mogelijk om op rationele gronden aan te geven welke dosering van een antibioticum toereikend is om een infectie door een verwekker met bekende in-vitro gevoeligheid te genezen ¹. Bij de thans gangbare methodiek voor de keuze en de dosering van een antibioticum wordt er vanuit gegaan dat er een correlatie aanwezig is tussen de in-vitro gevoeligheid van de bacterie en het in-vivo resultaat van de behandeling. Het bestaan van een dergelijke correlatie wordt echter onvoldoende door experimenteel werk ondersteund. Omdat de weefsel- en serumconcentratie kan worden geregeld via de dosering is het verband tussen de dosis en de in-vitro gevoeligheid van een verwekker toegankelijk voor experimentele studies.

In de geneeskunde heeft men om begrijpelijke redenen de neiging om bij de bestrijding van infecties antibiotica ruim te doseren. De maximaal toelaatbare dosis wordt bepaald door de toxicologische eigenschappen van het antibioticum en de daaruit voortvloeiende kans op schadelijke bijwerkingen. Indien men er in slaagt via de dosering een serumconcentratie te bereiken die gedurende langere tijd de waarde van de in-vitro gevoeligheid overtreft blijkt in de klinische praktijk de patiënt veelal gunstig te reageren ². Bij antibiotica die binding met serumeiwitten vertonen dient de concentratie niet-gebonden antibioticum in het serum de in-vitro gevoeligheidswaarde te overtreffen ³. Toch blijft er behoefte bestaan aan informatie over de minimale werkzame weefsel- en serumconcentratie, die in staat is een infectie te genezen. Omdat deze concentraties van stam tot stam kunnen verschillen dient daarbij ook aandacht geschonken te worden aan de eigenschappen van de verwekker van de infectie. Met behulp van deze informatie zou het op meer verantwoorde wijze dan thans het geval is, mogelijk zijn de in-vivo gevoeligheid van de verwekker te voor-

spellen. De uitkomsten van de in-vitro gevoeligheidsbepalingen zouden hierdoor ook beter geïnterpreteerd kunnen worden als gevoelig, matig gevoelig of ongevoelig.

Proefopzet. In dit proefschrift wordt aan de hand van een experimentele infectie onderzocht of bepaalde eigenschappen van de bacteriën kunnen worden gerelateerd aan de resultaten van de antimicrobiële behandeling van de infectie dus aan de zogenaamde in-vivo gevoeligheid. Als infectiemodel werd gekozen voor een pyelonefritis bij de rat veroorzaakt door een *E.coli*. De behandeling werd uitgevoerd met ampicilline. Om een betere vergelijking mogelijk te maken tussen de in-vitro en in-vivo omstandigheden werd het antibioticum via een continu infuus toegediend, zodat onder beide omstandigheden een constante antibioticum concentratie inwerkt op de bacteriën. De hiervoor ontwikkelde techniek wordt in Hoofdstuk II beschreven.

Toepassing van een nier infectiemodel maakt het gewenst over gegevens te beschikken betreffende de antibioticum concentratie op de plaats van de infectie. Immers uitscheidings- en reabsorptie processen kunnen in de nier aanleiding geven tot grote concentratie verschillen. Om inzicht te verkrijgen in de vermoedelijke concentratie op de plaats van de infectie werden een drietal analyse technieken toegepast, namelijk analyse van weefselhomogenaten, analyse van renale lymfe en autoradiografie (Hoofdstuk III).

Het infectiemodel, de *E.coli* pyelonefritis en het daaruit ontwikkelde therapiemodel wordt beschreven in Hoofdstuk IV. Het in-vivo resultaat van de behandeling van een infectie is niet alleen afhankelijk van de gevoeligheid van de stam, maar ook van andere kenmerken van de gast en de gastheer. Bij de gast verdient daarbij de virulentie vooral de aandacht. Daarom werd de virulentie van de onderzochte stammen bepaald en gerelateerd aan de in-vivo gevoeligheid tijdens de behandeling (Hoofdstuk V).

In Hoofdstuk VI worden de uitkomsten geëvalueerd van een aantal kwantitatieve bepalingen van de in-vitro gevoeligheid van *E.coli* voor ampicilline. Omdat verondersteld werd dat ook de snelheid waarmee het antibioticum inwerkt op de bacterie van invloed zou kunnen zijn op de in-vivo gevoeligheid werd het verloop van de afstervingscurven van de *E.coli* stammen onder invloed van ampicilline bestudeerd.

In Hoofdstuk VII tenslotte wordt nader ingegaan op de verbanden welke

eventueel aanwezig zijn tussen de in-vivo en in-vitro resultaten die in dit onderzoek werden verkregen.

ONTWIKKELING VAN EEN CONTINU INFUUS-SYSTEEM VOOR LANGDURIG GEBRUIK ^{*}.

Inleiding.

Technieken voor een continu infuus via een intra-veneuze of intra-arteriële weg bij kleine dieren, zoals de rat, zijn beschreven door Cox en Beazley en door Sindram e.a. ^{4,5}. In de praktijk blijkt echter dat een dergelijk infuus na relatief korte tijd blokkeert door stolling van het bloed. Om dit te voorkomen worden hoge infuussnelheden (voor de rat 1 ml/uur of meer) toegepast of wordt heparine toegediend om stolling van het bloed tegen te gaan.

Aangezien in deze studie meer-daagse infuusperioden vereist waren werd het onaanvaardbaar geacht met infuussnelheden hoger dan 0,5 ml/uur te werken. Toediening van heparine was eveneens uitgesloten aangezien het stolsel vrijhouden van de catheter plaatselijk hoge heparine concentraties vereist. Gelijktijdig toedienen van heparine en een antibioticum in hetzelfde infuus kan leiden tot een ongewenste interactie tussen beide middelen. Toediening via een andere route van het heparine zou de rat in totaliteit in een onstolbare toestand brengen hetgeen zou interfereren met in het infectiemodel toe te passen handelingen zoals oogpuncties.

In dit hoofdstuk wordt een techniek beschreven, die het mogelijk maakt bovenvermelde problemen te vermijden. Bij deze techniek wordt de infuus-vloeistof langs indirecte weg in de bloedbaan gebracht.

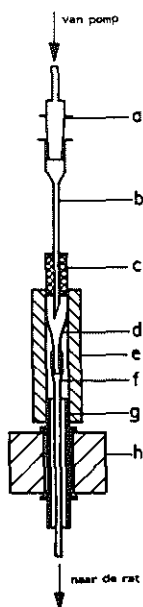
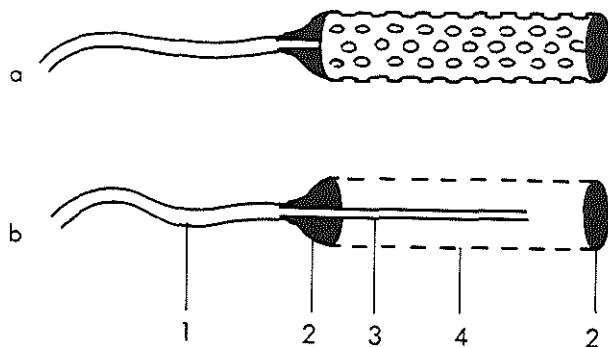
Methoden en materialen.

Het infuus-systeem bestaat uit een infuuspomp (Varifusor, Cenco), een wartel, een weefsel-kamer en verbindingslijnen (manometerlijn, Portex).

^{*} De inhoud van dit hoofdstuk werd grotendeels gepubliceerd:

Thonus IP, De Lange-Mac Daniël AV, Otte CJ and Michel MF. Tissue cage infusion: a technique for the achievement of prolonged steady state in experimental animals. *J Pharmacol Methods*, 1979; 2: 63-69.

Figuur II-1. Teflon infuus-kamer. (a) vooraanzicht, (b) longitudinale doorsnede; (1) polyethyleen slang; (2) afdichtingen van siliconen pasta; (3) teflon (AWG 30) catheter; (4) geperforeerde teflon buis (id 5 mm, od 7 mm, lengte 30 mm, ϕ perforatie 1,2 mm, 30% perforatie).



Figuur II-2. Wartel. (a) infuuslijn van pomp met luer aansluiting, (b) naald (38 x 1,1 mm, 19 G), (c) afdichting van uitgeharde siliconen pasta, (d) glazen verbindingstuk (deel van Pasteur pipette), (e) transparant dikwandig PVC slang (ca. 5 cm), dat stevig klemt rond glas en stalen buis, hiermede wordt het glazen verbindingstuk (d) op zijn plaats gehouden boven de stalen buis (g), (f) polyethyleen slang (diam. 0,5 mm) die via een aan de onderzijde van de wartel aan te brengen stalen veer (niet weergegeven) de verbinding tot stand brengt tussen wartel en weefsel-kamer in het dier, (g) stalen buis (50 x 6 cm) op zijn plaats gehouden in blok h d.m.v. veerklemmen. Deze buis kan vrij draaien in blok h. Aan de onderzijde van deze buis wordt de stalen veer bevestigd, die op zijn beurt vast zit aan het tuigje van de rat, (h) blokje hard PVC plastic dat de wartel draagt. D.m.v. een klem op een statief wordt blokje h boven de kooi op zijn plaats gehouden.

Weefsel-kamer. De weefsel-kamers (Figuur II-1) werden gemaakt van teflon-buis (od 7 mm, id 5 mm, Eriks). Stukjes van 30 mm lengte werden voorzien van perforaties (\varnothing 1,2 mm) op een zodanige wijze, dat circa 30% van het oppervlak geperforeerd was. De uiteinden van de buisjes werden afgedicht met siliconen pasta (Silastic Medical Adhesive Silicone Type A, Dow Corning). Na het harden van de afdichtingen werd een 30 mm. lange teflon catheter (AWG 30, Eriks) gedeeltelijk in de kamer gebracht met behulp van een holle naald, die door de afdichting werd gestoken. Het deel buiten de kamer werd verbonden met een stukje flexibele polyethyleen slang (lengte 50 mm, id 0,5 mm). De overlap-verbinding werd verstevigd met siliconen pasta. Voor gebruik werden de kamers met stoom gesteriliseerd. In een vroeg stadium van de experimenten werden de kamers vervaardigd van siliconen rubber.

Wartel. In Figuur II-2 is de toegepaste wartel afgebeeld. Onderdelen b, c en d vormen een draaibare verbinding waardoorheen vloeistof kan stromen. Draaibewegingen van het dier resulteren in rotatie van de glazen verbindingsbuis (d) rondom de naald (b). De uitgeharde siliconen afdichting voorkomt lekken van het systeem. Een voordeel van deze wartel is, dat de onderdelen die in contact met de infuusvloeistof komen makkelijk te verwisselen zijn. De onderdelen bestaan uit ofwel steriel ingekochte, danwel steriliseerbare wegwerp artikelen.

Behandeling der ratten. De experimenten werden uitgevoerd met vrouwelijke albino ratten (R-stam, gefokt in het Centraal Proefdieren Bedrijf, Medische Faculteit Rotterdam, gewicht 175 à 225 g).

Alle chirurgische of mogelijkwijze pijnlijke ingrepen werden onder lichte narcose (ether roes of 0,1 ml/100 g rat hypnorm) uitgevoerd. Bloed voor de bepaling van het ampicilline gehalte werd afgenomen door middel van oogpuncties of met behulp van een carotis catheter. Deze catheter werd door regelmatig spoelen met een heparine oplossing (0,5 mg/ml) opengehouden.

De weefsel-kamer werd subcutaan geïmplanteerd aan de rugzijde van de rat. Via een kleine incisie in de nek werden zij caudaal ingebracht onder de huid, zodanig dat het eind van het polyethyleen slangetje zich ter plekke van de incisie bevond. Na een inkapselingsperiode van 7 à 8 weken, werd de polyethyleen slang in de nek van de rat door een hernieuwde incisie vrijgemaakt en verbonden met de rest van het infuus-systeem. Na sluiting der incisie werd de rat in een tuigje, vervaardigd

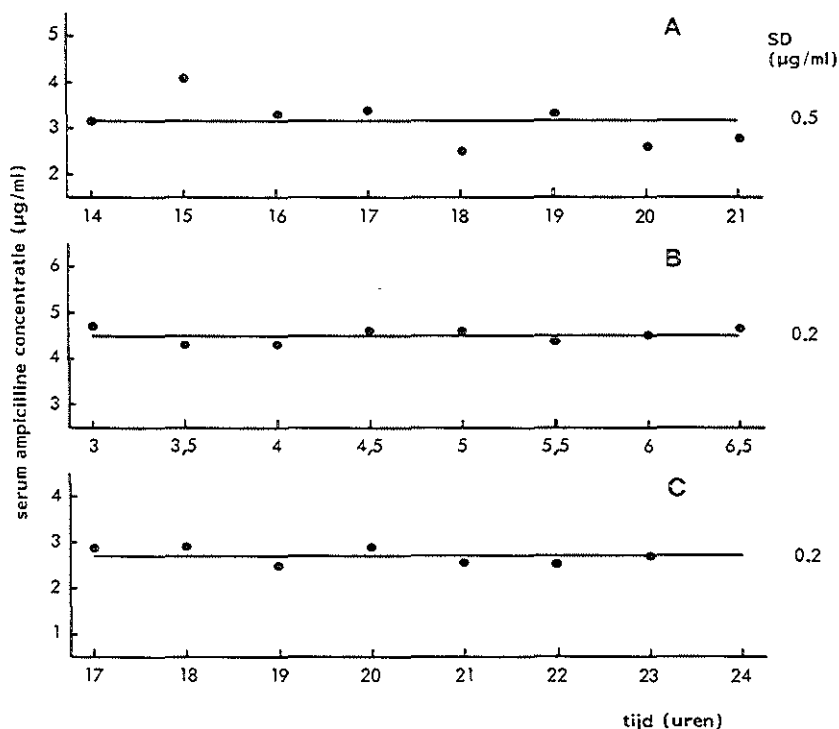
uit flexibel PVC slang en pleister, geplaatst. Door een buigbare metalen veer verbonden aan het tuigje werd de infuus-catheter naar de wartel geleid. De verbinding tussen veer en wartel werd gevormd door een stukje dikwandig PVC slang. In deze opstelling waren de ratten weliswaar enigszins belemmerd in hun bewegingen, maar konden zij zich toch redelijk vrij in de kooi verplaatsen.

Bij de experimenten met pentobarbital natrium (Nembutal) narcose, werd dit middel intra-peritoneaal geïnfundeerd via een nylon catheter. Na een initiële dosis van 6 mg werd een infuus gegeven van 3 mg/uur. *Ampicilline bepaling.* Ampicilline gehalten in serum werden bepaald via een standaard agar-diffusie techniek (grote plaat 30 x 30 cm.) op DST-agar (Oxoid) met een *Staphylococcus aureus* stam als indicator organisme ⁶. Elke bepaling werd in duplo uitgevoerd met 50 µl rattenserum. In langdurige experimenten met veel meetpunten, werd volstaan met enkelvoudige bepalingen, om het verlies aan bloed per rat te minimaliseren. De variatie coëfficiënt (CV) van de bepaling bleek 4% te bedragen voor oplossingen van 2,5 en 5 µg/ml ampicilline (20 bepalingen).

Resultaten.

In Figuur II-3 zijn de resultaten van drie infuus-experimenten weergegeven. Ampicilline (20 mg/ml) in fysiologisch zout (FZ) werd toegediend met een snelheid van 0,125 ml/uur. Bloed werd afgenomen via een carotis catheter. Figuur II-3 a toont de resultaten verkregen door toepassing van een weefsel-kamer van siliconen rubber. De evenwichtstoestand werd bereikt bij een serumconcentratie van 3,1 µg/ml (uitersten: 2,5 - 4,1 µg/ml; SD = 0,5 µg/ml). De variatie in de bepaling (4%) kan de grote fluctuaties in dit experiment (CV = 16%) niet verklaren. Aan gezien de siliconen rubber kamers makkelijk kunnen vervormen onder invloed van bewegingen van de rat, werd onderzocht welk concentratie verloop werd verkregen bij een soortgelijk experiment bij een rat onder narcose. Figuur II-3 b toont de resultaten van zo'n experiment, waarbij een siliconen rubber kamer werd gebruikt, terwijl de rat onder nembutal narcose verkeerde. De evenwichtsconcentratie had een waarde van 4,5 µg/ml (uitersten: 4,2 - 4,8 µg/ml; SD = 0,2 µg/ml. Uit het tweede experiment werd geconcludeerd dat de fluctuaties in de serum gehalten tijdens het eerste experiment inderdaad het gevolg waren van de flexibiliteit van de siliconen rubber kamer. Dientengevolge werd overgegaan op het gebruik

Figuur II-3. Serumconcentraties van ampicilline. De ratten werden geïnfundeerd met 20 mg/ml ampicilline in fysiologisch zout. De infuussnelheid bedroeg 0,125 ml/uur. A. weefsel-kamer van siliconen rubber; B. als A. echter bij een met nembutal genarcotiseerde rat; C. weefsel-kamer van teflon.

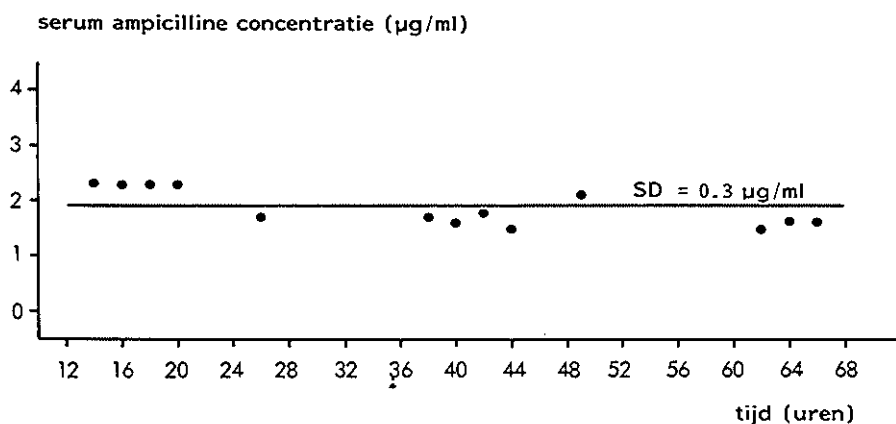


van stijver materiaal. Figuur II-3 c toont het resultaat van een infuus-experiment waarbij gebruik werd gemaakt van een teflon weefsel-kamer. In evenwicht werd een concentratie van 2,7 µg/ml bereikt (uitersten: 2,5 - 2,9 µg/ml; SD = 0,2 µg/ml). Het blijkt dat met dit materiaal de optredende fluctuaties volledig aanvaardbaar zijn.

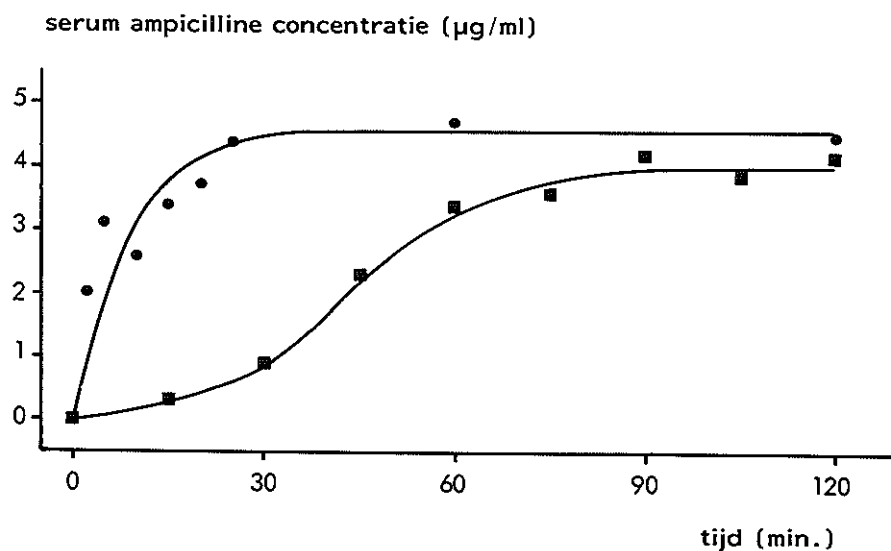
In Figuur II-4 is een infuus-experiment over 68 uur met gebruik van een teflon weefsel-kamer weergegeven. Toediening van 10 mg/ml ampicilline met een snelheid van 0,125 ml/uur geeft een evenwichtsconcentratie van 1,9 µg/ml (uitersten: 1,5 - 2,3 µg/ml; SD = 0,3 µg/ml). Experimenten met een infuusduur tot 8 dagen gaven vergelijkbare uitkomsten.

In vergelijking met een i.v.-infuus vertoont het weefsel-kamer infuus een aanloopfase in de opbouw van de evenwichtstoestand. Figuur II-5 laat zien dat het evenwicht met behulp van de weefsel-kamer techniek circa

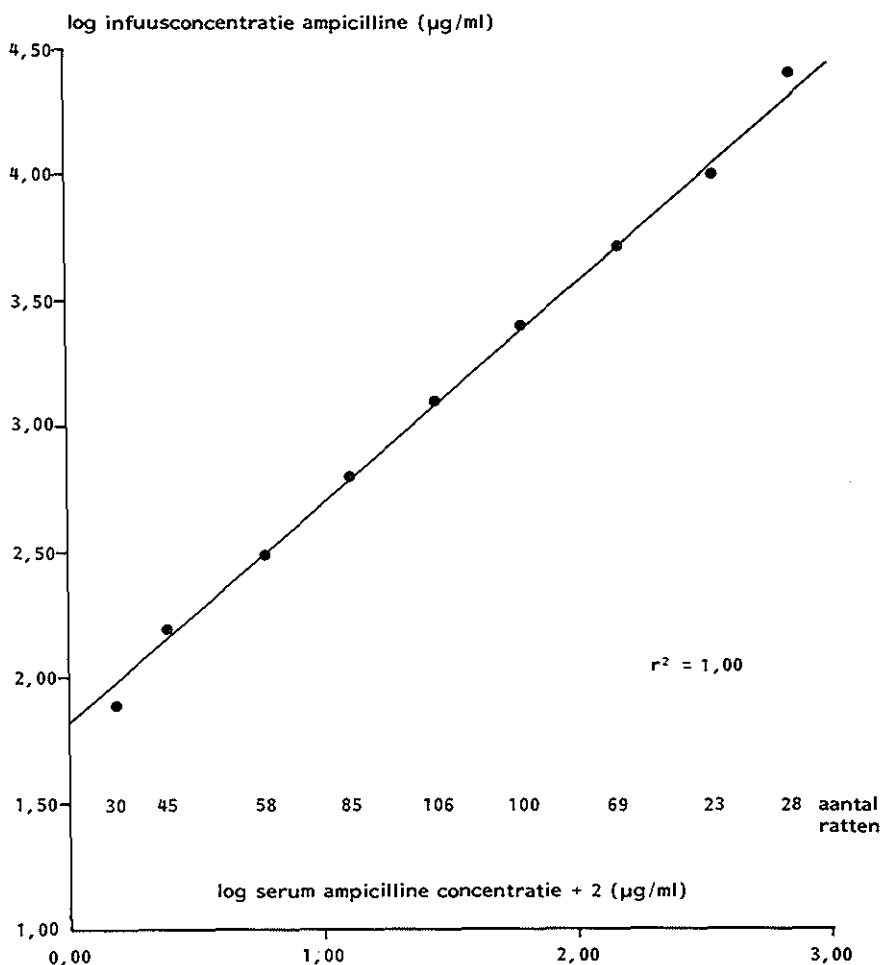
Figuur II-4. Serumconcentratie van ampicilline. De rat werd geïnfundieerd met 10 mg/ml ampicilline in fysiologisch zout; infuussnelheid 0,125 ml/uur. De weefsel-kamer werd vervaardigd uit teflon.



Figuur II-5. Serumconcentraties van ampicilline gedurende de eerste fase van het infuus. (●) Intraveneus infuus. Canule in Vena femoralis. Dosis 5 mg/ml ampicilline in fysiologisch zout; infuussnelheid 0,4 ml/uur. (■) Teflon weefsel-kamer infuus. Dosis 20 mg/ml ampicilline in fysiologisch zout; infuussnelheid 0,125 ml/uur.



Figuur II-6. Relatie tussen infuus concentratie en evenwichtskoncentratie in serum. Teflon weefsel-kamer infuus, infuussnelheid 0,125 ml/uur. Elk punt vertegenwoordigt het gemiddelde van de waarnemingen bij het vermelde aantal ratten.



40 minuten later wordt bereikt dan bij i.v. toediening.

Tenslotte is in Figuur II-6 de relatie tussen serumconcentratie en infuusconcentratie weergegeven. Over het gehele traject blijkt een lineair verband tussen beide grootheden te bestaan (lineaire regressie: $r^2 = 1,00$).

Discussie.

Weefsel-kamers werden voor het eerst gebruikt door Guyton ⁷. Hij paste

deze toe voor het meten van interstitiële drukken. Andere onderzoekers gebruikten de kamers voor het bepalen van antibioticum gehalten in de interstitiële ruimten ^{8,9}. In deze studie werd aangetoond, dat weefselkamers eveneens aangewend kunnen worden voor het toedienen van een infuus. Daarbij is echter wel van belang dat voor de vervaardiging van de kamers het juiste materiaal wordt gekozen.

Gedurende het infuus is de ruimte in de kamer gevuld met een vloeistof die een hoge concentratie werkzame stof bevat. Indien de kamer van een buigbaar materiaal is vervaardigd, kan het normale diffusie proces vervangen worden door een injectie proces, waarbij onder invloed van drukverschillen ten gevolge van de bewegingen van de rat de vloeistof uit de holle ruimten wordt geperst. Het gevolg hiervan is dat grote fluctuaties in de serumconcentraties optreden. De experimenten die onder narcose werden uitgevoerd hebben deze vermoedens volledig bevestigd, aangezien er bij een geïmmobiliseerde rat geen fluctuaties optreden.

De tijd benodigd voor de inkapseling en vascularisatie van de kamer is kritisch. Calnan beschreef dat dit proces circa 4 - 6 weken vergt ⁸. In deze studie is een periode van 7 à 8 weken aangehouden. Slechts 5% der kamers functioneerden na deze periode niet naar behoren. Indien de termijn wordt verkort loopt het aantal uitvallers sterk op. Narcose beïnvloedt het metabolisme van de rat en daarmee de uitscheiding van ampicilline. Daarom moet na een canulering onder narcose geruime tijd worden gewacht alvorens het infuus wordt gestart. Voor de zekerheid is in deze studie een wachttijd van 24 uur aangehouden.

Infuus-experimenten van enkele dagen vertonen een toeneming in de fluctuaties rond de evenwichtsconcentratie. Een of meer van de volgende oorzaken kunnen daarbij een rol spelen: (i) de dag tot dag variatie in de ampicilline bepaling, (ii) kleine verschillen in antibioticum concentraties van verschillende infuus-oplossingen of (iii) de bloedarmoede en/of stress die kan ontstaan na herhaalde oogpuncties.

Vanuit farmaco-kinetisch oogpunt was het optreden van een aanlooffase gedurende de opbouw van de evenwichtstoestand te voorspellen. Immers, de weefsel-kamer functioneert als een extra buffercompartiment, dat eerst zelf op peil gebracht moet worden.

Door Gong en De Luca werd in 1978 een techniek beschreven, waarbij een evenwichtstoestand in een proefdier wordt onderhouden, door een langzame diffusie van een werkzame stof via een semi-permeabele wand vanuit

een subcutaan geïmplanteerde weefsel-kamer ¹⁰. Het toe te dienen middel werd hierbij éénmalig en wel vooraf aan het systeem toegevoegd. Een enigszins hiermee vergelijkbaar systeem, wordt sedert 1979 door Alza Corporation op de markt gebracht: Alzet; osmotic mini pump. Ook bij dit systeem wordt het toe te dienen middel vooraf ingebracht. Na implantatie wordt ten gevolge van een osmotisch proces de toegevoegde vloeistof langzaam uit het systeem gepompt. Afhankelijk van de grootte van het systeem bedraagt de infuusduur 7 à 14 dagen. Voorwaarde voor toepassing is echter, dat het toe te dienen middel gedurende deze periode stabiel blijft. Dit is voor ampicilline niet het geval.

Toepassing van een weefsel-kamer infuus bij kleine proefdieren heeft als voordeel boven de i.v. infuustechniek, dat gewerkt kan worden met zeer lage infuussnelheden, dat ontstollingsmiddelen overbodig zijn, dat geen flebitis kan optreden en dat er geen speciale maatregelen nodig zijn indien men het infuus voor kortere of langere duur stop zet. Uiterlijk lijkt het proefdier nauwelijks hinder te ondervinden van de ingebrachte weefsel-kamer. De gewichtscurven van de ratten met kamer verschilden niet van die van de ratten zonder kamer. Bij de proef-opzet dient echter wel rekening gehouden te worden met de langdurige inkapselingsperiode.

INTRA-RENALE VERDELING VAN AMPICILLINE IN DE GEZONDE EN GEINFECTEERDE NIER VAN DE RAT.

Inleiding.

Een geldige vergelijking tussen het in-vivo en het in-vitro effect van een antibioticum op bacteriën is alleen mogelijk als de micro-organismen onder beide omstandigheden worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van het middel. Bij in-vitro onderzoek kan men de concentratie zelf bepalen. Bij in-vivo studies is het minder eenvoudig om de concentratie op de plaats van de infectie vast te leggen.

De wijze van toediening van het antibioticum aan het proefdier bepaalt in hoge mate het verloop van de antibioticum spiegel. Door toepassing van een continu infuus kan in het dier een evenwichtstoestand worden teweeg gebracht waarbij de concentratie in het serum is in te stellen met behulp van de concentratie in het infuus. Men dient er echter wel rekening mee te houden dat een infectie de structuur van het weefsel zodanig kan veranderen, dat het antibioticum daarin niet langer normaal kan binnendringen. Tenslotte geldt dat in de nier, in deze studie het geïnfecteerde orgaan, het antibioticum gehalte beïnvloed wordt door excretie- en reabsorptieprocessen. Ampicilline wordt uitgescheiden via glomerulaire filtratie en proximaal tubulaire secretie. Afhankelijk van de pH van de urine kan in het distale deel van het nefron niet-ionische diffusie van het middel plaatsvinden (pK_{a1} : 2,7; pK_{a2} : 7,5) ¹¹.

Voor het vaststellen van de intra-renale verdeling van antibiotica kan gebruik gemaakt worden van de volgende methoden: analyse van weefselhomogenaten, analyse van renale lymfe, autoradiografie en fluorescentie en zogenaamd stop-stroom onderzoek (zie voor overzicht ¹²). Bij dit onderzoek werden drie van deze technieken toegepast. In het kort wordt ingegaan op voor- en nadelen van deze methoden.

Bepaling van de antibioticum concentratie in weefselhomogenaten. De methode is eenvoudig qua uitvoering. De bepaling van het antibioticum

gehalte in de supernatant van het gehomogeniseerde weefsel kan chemisch of microbiologisch worden uitgevoerd. Een nadeel van deze methode is dat de concentratie die men meet de resultante is van de concentraties in de verschillende weefsel-vloeistoffen. In het geval van nierweefsel heeft vermenging plaats van bloed, interstitiële vloeistof en urine. Omdat in de urine hoge ampicilline concentraties voorkomen bestaat de kans dat de antibioticum concentratie in het weefselhomogenaat sterk wordt beïnvloed door urine bijmenging.

Bepaling van de antibioticum concentratie in renale lymfe. Algemeen wordt aangenomen dat lymfe overeenkomt met de uit de weefsels afgevoerde interstitiële vloeistof. De concentratie in lymfe afkomstig van een bepaald orgaan geldt dan ook als de ideale benadering van de weefselconcentratie in dat orgaan. Voorwaarde is echter wel dat de lymfe, die wordt opgevangen, rechtstreeks afkomstig is van het bestudeerde orgaan. Renale lymfe is een mengsel van het plasma transudaat en de tubulair gereabsorbeerde hoeveelheid antibioticum en reflecteert waarschijnlijk de interstitiële vloeistof concentratie in de nier ¹³.

Autoradiografie en fluorescentie. Deze technieken kunnen waardevolle informatie verstrekken over de intra-renale verdeling en de cellulair lokaliserende van een antibioticum. Nadeel van deze methode is dat kwantificering van de aanwezige hoeveelheden niet eenvoudig is en dat men geen onderscheid kan maken tussen bio-inactieve metaboliëten en het bio-actieve antibioticum.

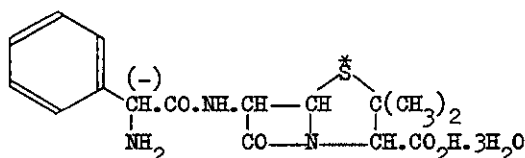
Uit de literatuur blijkt dat de meeste auteurs zich bij hun onderzoek tot één methodiek beperken. De uitkomsten die door verschillende auteurs werden verkregen lopen nogal uiteen. Naber vond bij honden dat de ampicilline concentratie in lymfe circa 85% van de serumconcentratie bedroeg ¹⁴. Whelton vond dat de concentratie in de cortex afhankelijk van de waterhuishouding van de hond circa 3 - 6 maal de serumconcentratie bedroeg ¹⁵. Mede gezien de uiteenlopende waarden die door verschillende auteurs werden verkregen en omdat wij geïnteresseerd waren in de antibioticum concentratie in een infectiehaard, werd in de hierna volgende studie gebruik gemaakt van 3 technieken voor het vaststellen van de intra-renale verdeling van ampicilline: analyse van cortex weefselhomogenaat, analyse van renale lymfe en autoradiografie.

Materialen en methoden.

Ratten. Bij het lymfe onderzoek werden 4 maanden oude manlijke ratten van stam WR (Wag/Rij) met een gewicht van circa 250 - 300 g. gebruikt. Voor het homogenaat onderzoek en de autoradiografie werden 3 maanden oude vrouwelijke ratten van stam R, gefokt in het Centraal Proefdieren Bedrijf van de Erasmus Universiteit Rotterdam, met een gewicht van circa 200 - 250 g. gebruikt.

Canules. Portex PP 100 (id 0,86; od 0,52) voor *Vena jugularis*; Portex PP 50 (id 0,58; od 0,96) voor *Arteria carotis*; Portex PP 50, uitgetrokken tot od 0,45 voor lymfe vat.

Medicamenten. Hypnorm (Philips-Duphar); ampicilline (Penbritin, Beecham); ^{35}S -ampicilline trihydraat (vervaardigd en welwillend ter beschikking gesteld door Beecham Pharmaceuticals).



Specifieke activiteit: 43,3 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (18-1-1980), radiochemische zuiverheid: 98,8% (bepaald met behulp van HPLC), antibioticum activiteit: 920 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Antibioticum bepaling.

Microbiologische bepaling. Toegepast werd een agar-diffusie techniek met een *S. aureus* stam als indicator organisme (zie materialen en methoden Hoofdstuk II). Voor de bepalingen in serum en lymfe werden serum-standaarden en voor de bepaling in het weefselhomogenaat werden homogenaat-standaarden toegepast.

Radiochemische bepaling. Hiertoe werd 0,1 ml bloed opgenomen in 5 ml Insta-gel (Packard Chemicals). Het aantal tellen per minuut (cpm) werd gemeten in een vloeistofscintillatie teller (PW 450, Philips). Met behulp van de externe standaard ratio en een dovingscurve werden de cpm waarden omgerekend tot aantal desintegraties per minuut (dpm).

Statistiek. Met behulp van de Mann-Whitney toets is onderzocht of er

Tabel III-1. *Proefomstandigheden van de groepen ratten, welke betrokken waren bij het weefselhomogenaat- en lymfe-onderzoek.*

Groep	Aantal en geslacht der ratten	Infuus ¹ concentratie mg/ml	Infectie +/- ²	Narcose +/- ³	Bijzonder- heden
I	4 ♂	0,25	-	+	geen
II	4 ♂	0,5	-	+	geen
III	5 ♂	0,5	+	+	geen
IV	3 ♂	0,5	-	+	infuus gestopt
V	3 ♀	0,5	-	-	geen
VI	3 ♀	20,0	-	-	geen

¹ Infuussnelheid 1,2 ml/uur.

² - = geen infectie; + = infectie met *E.coli* TO 3; 4 dagen tevoren aan-
gebracht.

³ - = geen narcose; + = wel narcose tijdens de infuusperiode: initieel
0,1 ml/100 g rat hypnorm i.m., onderhouden m.b.v. ether-inhalatie.

significante verschillen aanwezig waren tussen de verschillende groepen ratten.

Analyse van cortex weefselhomogenaat. Bij dit onderzoek waren 22 ratten betrokken, 16 hiervan waren eveneens betrokken bij het lymfe onderzoek. Als uitvloeisel hiervan waren deze 16 ratten tijdens de infuusperiode onder narcose. In Tabel III-1 zijn de verschillende proefomstandigheden van de 6 geformeerde groepen ratten weergegeven.

Procedure tot en met de sectie. Voor de ratten van groep I t/m IV wordt voor de handelingen tot en met de infuusperiode verwezen naar de sectie: Analyse van de lymfe. Na de periode waarin de lymfe werd opgevangen, werden de nieren van deze ratten verwijderd.

Bij de ratten van de groepen V en VI werd onder een lichte ether roes de *Vena jugularis* gecanuleerd. Nadat de ratten waren hersteld werden zij aangesloten op de infuuspomp en gedurende 2½ uur geïnfundeerd met ampicilline, opgelost in fysiologisch zout (FZ). Na de infuusperiode werden de ratten gedood met ether. Bij de sectie werd via hartpunctie bloed afgenomen en werden de nieren verwijderd.

Bereiding weefselhomogenaat. Na het verwijderen van de nieren werden deze licht bevroren door onderdompeling in vloeibare stikstof. Vervolgens werden stukjes cortex weefsel van de polen van beide nieren afgesneden.

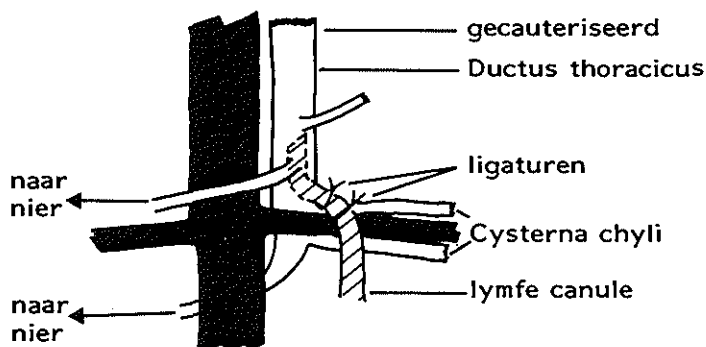
Het weefsel werd bij -18°C bewaard totdat de spiegel bepaling plaatsvond (bewaarperiode korter dan 2 weken). Op de dag van de antibioticum bepaling werd het weefsel, na te zijn ontdooid, gewogen en werd FZ in een bepaalde verhouding toegevoegd (3 ml FZ op 0,69 g weefsel). Deze verhouding werd zowel bij de bereiding van de monsters als bij de bereiding der standaarden aangehouden. Vervolgens werd het weefsel met behulp van een teflon/glas homogenisator volgens Potter-Elvehjem (15 ml, speling 0,15 mm) gehomogeniseerd. Het homogenaat werd gedurende 1 minuut gecentrifugeerd bij 14000 toeren per minuut in een Eppendorf centrifuge. In het supernatant werd de concentratie ampicilline microbiologisch bepaald. Bij de berekening van het ampicilline gehalte per gram weefsel is uitgegaan van een watergehalte in de cortex van 80% ¹⁵.

Analyse van de lymfe. Bij dit onderzoek waren 16 ratten betrokken verdeeld over 4 groepen. De proefomstandigheden voor deze groepen (I t/m IV) zijn weergegeven in Tabel III-1.

Procedure. Voorafgaande aan de canulering werden de ratten via de penis vene ingespoten met 0,5 ml 1% Evans Blue oplossing. Hierdoor werd de zichtbaarheid van het lymfatisch systeem vergroot. Nadat het dier met hypnorm onder narcose was gebracht werden de *Vena jugularis* en de *Arteria carotis* via een incisie in de nek gecanuleerd. Nadat de veneuze canule was aangebracht werd het ampicilline infuus gestart. Vervolgens werd de arteriële canule aangebracht. Om deze laatste canule gedurende het experiment open te houden werd deze aangesloten op een spuit met een heparine oplossing (50 I.U./ml).

Vervolgens werd de buik geopend door middel van een mediane incisie en werd het gebied rond de *Cisterna chili* en de *Ductus thoracicus* met behulp van micro-chirurgische instrumenten vrij geprepareerd. Na onderbinding van de *Cisterna chili* werd proximaal van de ligatuur een canule ingebracht en bevestigd. Vervolgens werden proximaal en links lateraal de lymfe kanalen gecauteriseerd (zie Figuur III-1). Na enige tijd stroomde blauw gekleurde lymfe uit de canule. Deze werd opgevangen in een gehepariniseerde capillaire buis (lengte 75 mm, id 1.1 - 1.2). Vervolgens werd de buik gesloten met autoclips. Gedurende de opvangperiode werd geen afname van de lymfe productie waargenomen. Gedurende de hele proefperiode werd de narcose van de rat voortgezet door middel van ether inhalatie op geleide van de ademhaling en het hartritme, zoals waargenomen in de arteriële canule. Twee en een half uur na het begin van het infuus

Figuur III-1. *Situatieschets van het aanbrengen van de lymfe canule.*
Bron: Greene EC. Anatomy of the rat. In: *Trans Am Phil Soc XXVII*. New York,
Londen: Hafner Publ Comp, 1968: 330.



werd met het verzamelen van de lymfe begonnen. Via de arteriële canule werd 0,1 ml bloed afgenomen en werd de eerste capillair voor opvang van de lymfe geplaatst. Nadat circa 30 μ l lymfe was verkregen werd opnieuw bloed afgenomen en werd een tweede capillair geplaatst. Deze handelingen werden herhaald tot de beëindiging van het experiment. Het ampicilline gehalte in lymfe en serum werd via microbiologische weg bepaald. Bij enkele experimenten werd na afname van het derde bloedmonster de infuus-pomp gestopt, terwijl de afname van bloed en lymfe werd voortgezet.

Autoradiografie. Bij deze experimenten werden 4 ratten gebruikt, die geïnfundeerd werden met radio-actief (^{35}S) gemerkt ampicilline. Twee gezonde ratten werden geïnfundeerd met respectievelijk 132 $\mu\text{g/ml}$ en 66 $\mu\text{g/ml}$ ampicilline in FZ (infuusnelheid 1,2 ml/uur). De beide andere ratten met een 1 dag en een 4 dagen oude infectie met *E.coli* TO 3 werden geïnfundeerd met 66 $\mu\text{g/ml}$ ampicilline (infuusnelheid 1,2 ml/uur). Onder hypnorm narcose (0,1 ml/100 g rat, i.m.) werd de *V.jugularis* en de *A.carotis* ge-canuleerd. Vervolgens werden de ratten gedurende 2½ uur geïnfundeerd via de *V.jugularis*, waarbij de narcose werd onderhouden door middel van ether inhalatie. Direct na afloop van de infuusperiode werd via de *A.carotis* bloed afgenomen en werden de ratten ingevroren in een mengsel van aceton en vast CO_2 . De bevroren ratten werden geschoren en ingebed in carboxymethylcellulose waarna met behulp van een cryostaat-microtroom coupes met een dikte van 30 μm werden gesneden. De coupes werden op

fotografische platen (Agfa-Structurix D 7) gelegd. Na 3 maanden expositie werden de autoradiogrammen ontwikkeld. Op de fotografische emulsie werd in enkele gevallen naast de coupes een met ^{14}C gemerkte glucose ladder geplaatst.

Na ontwikkeling werden enkele autoradiogrammen doorgemeten met een optische dichtheidsmeter (ontwikkeld bij Beecham Pharmaceuticals, Research Division). De gemeten zwartingen werden met behulp van de ladder-zwartingen en een ijkcurve omgerekend in hoeveelheden μg ampicilline per gram weefsel. De hoeveelheid ampicilline in het bloed werd radiochemisch en microbiologisch bepaald. Nadat van de coupes de autoradiogrammen waren gemaakt werden zij gekleurd met een hematoxyline-eosine kleuring.

Resultaten.

Analyse van de cortex weefselhomogenaten. Van elke rat werden de ampicilline concentraties in de cortex weefselhomogenaten van de linker en rechter nier, alsmede die in het serum bepaald. Hoewel per rat verschillen in de concentraties in de rechter en linker nier werden waargenomen bleken deze verschillen per groep ratten niet significant te zijn. Dit gold zowel voor de ratten met normale nieren als voor de ratten met geïnfecteerde nieren. Daarom werd per rat een gemiddelde concentratie in de cortex van de nieren op basis van de uitkomsten van de linker en rechter nier berekend. Met de gemiddelde concentratie in het cortex weefsel en in het serum werd voor iedere rat de ratio van deze concentraties (ratio W/S) bepaald. In Tabel III-2 zijn per groep de mediane, de minimale en de maximale waarden voor de weefsel- en serumconcentraties en voor de ratio's W/S weergegeven. Het valt op dat de spreiding in de resultaten voor de groepen genarcotiseerde ratten groter is dan die voor de groepen niet-genarcotiseerde ratten.

Een vergelijking van de ratio's W/S per groep leert ons het volgende. Tussen de ratio's W/S van de groepen I, II en V bestaan geen significante verschillen. Hieruit mag afgeleid worden dat de ratio W/S bij gangbare serumconcentraties onafhankelijk is van de infuus-concentratie en niet beïnvloed wordt door de aanwezigheid van narcose tijdens het experiment. Vergelijkt men de mediane serumconcentratie en de mediane weefselconcentratie van groep II en groep V dan blijken deze wel degelijk beïnvloed te zijn door de narcose van de ratten. Deze invloed komt ook

Tabel III-2. Resultaten van de ampicilline bepalingen in de cortex weefselhomogenaten.

Groep	Aantal ratten	Infuus concentratie mg/ml	Serum concentratie ¹ µg/ml	Weefsel concentratie ² µg/ml	Ratio W/S ³	Proef-omstandigheden
I	4	0,25	4,1 (3,7-5,3)	18,8 (12,0-37,2)	4,3 (3,3-8,5)	normale nier, genarcotiseerd, ♂
II	4	0,5	7,4 (6,1-8,6)	33,4 (25,5-42,6)	5,2 (4,2-5,7)	normale nier, genarcotiseerd, ♂
III	5	0,5	8,6 (7,2-9,9)	22,8 (4,5-44,2)	2,8 (0,8-5,6)	geïnfecteerde nier, genarcotiseerd, ♂
IV	3	0,5	3,6 (2,0-3,6)	27,6 (8,2-42,4)	6,0 (5,3-11,0)	normale nier, genarcotiseerd, ♂ infuus gestopt.
V	3	0,5	0,8 (0,7-0,9)	4,4 (2,7- 5,7)	5,5 (3,9-5,8)	normale nier, niet-genarcotiseerd, ♀
VI	3	20,0	56,4 (53,1-58,0)	134,9 (119,8-195,0)	2,5 (2,1-3,3)	normale nier, niet-genarcotiseerd, ♀

¹ weergegeven zijn de mediane en de minimale en maximale waargenomen concentraties.

² per rat werd voor de cortex een gemiddelde concentratie berekend uit de waarnemingen in de linker en rechter nier; resultaten weergegeven zoals bij ¹.

³ weergegeven zijn de mediane en de minimaal en maximaal berekende ratio tussen de weefsel-concentratie en de serumconcentratie.

tot uiting in de halfwaarde tijd ($T_{1/2}$) van ampicilline in het serum. Voor een niet-genarcotiseerde rat bedraagt deze $T_{1/2}$ circa 20 à 25 minuten. Voor een genarcotiseerde rat circa 50 minuten. Het feit dat de niet-genarcotiseerde ratten van het vrouwelijk geslacht waren en de genarcotiseerde ratten tot het mannelijke geslacht behoorden, lijkt ons niet van invloed te zijn geweest op de uitkomsten. De mediane waarde van de W/S ratio van groep V bedraagt 5,5 en van groep VI 2,5. Dit verschil is significant ($p < 0,05$). Hieruit kan worden afgeleid dat een sterke verhoging van de infuus concentratie leidt tot een verlaging van de W/S ratio. Waarschijnlijk is er sprake van een verzadigingseffect bij de weefsel-concentratie.

De ratten met geïnfecteerde nieren hebben een significant ($p < 0,05$) lagere ratio W/S dan de gezonde ratten. Bij de ratten van groep III bedraagt de ratio 2,8 tegen een ratio van 5,2 bij de ratten van groep II. De ratten van groep IV waren afkomstig van de experimenten waarbij het infuus na het bereiken van de evenwichtstoestand werd stilgezet. Bij deze dieren werden de nieren verwijderd na het opvangen van de lymfe, dat wil zeggen circa 2 uur na stopzetten van het infuus. De ratio W/S van deze groep is weliswaar hoger dan die van groep II (6,0 tegen 5,2) maar het verschil is niet significant.

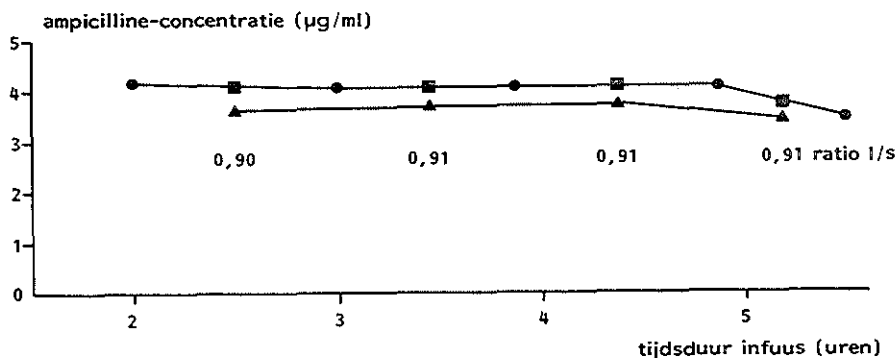
Analyse van de renale lymfe. In dit onderzoek werd onderzocht (i) of er een relatie aanwezig is tussen de infuus concentratie en de lymfe concentratie van ampicilline, (ii) in hoeverre de aanwezigheid van een infectie de lymfe concentratie van ampicilline beïnvloedt en (iii) hoe snel de klaring van ampicilline uit de renale lymfe is na het stopzetten van het infuus.

Het verloop van de ampicilline concentratie in serum en lymfe bij een gezonde rat, geïnfundeed met 0,25 mg/ml (infuussnelheid 1,2 ml/uur) is weergegeven in Figuur III-2. Aangezien de concentratie in de lymfe de resultante is van de concentraties die optraden gedurende de tijd benodigd voor de opvang van 30 μ l lymfe, wordt deze lymfe concentratie vergeleken met een gemiddelde serumconcentratie. Dit gemiddelde werd berekend uit de concentraties die aanwezig waren aan het begin en aan het einde van de opvangperiode die gemiddeld 27 minuten (SD 7,5 minuten) bedroeg. Uitgaande van deze gemiddelde serumconcentratie en de waargenomen lymfe concentratie werd de ratio van beide concentraties (ratio L/S) bepaald. In de figuur zijn naast de waargenomen ook de gemiddelde

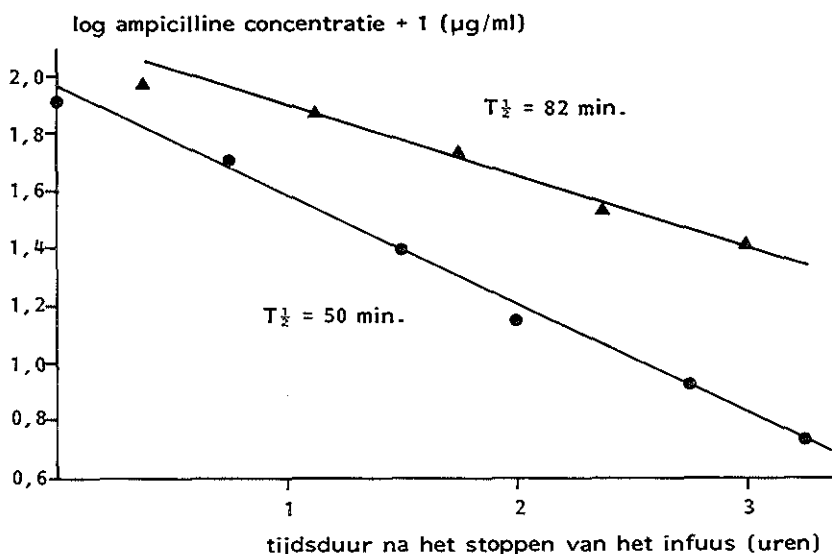
Tabel III-3. De resultaten van de ampicilline bepaling in de lymfe.
Weergegeven is de gemiddelde (\pm SD) ratio tussen de concentraties in de lymfe en in het serum voor 3 verschillende groepen ratten.

Groep	Aantal ratten	Infuus concentratie mg/ml	Ratio lymfe/serum	Proef-omstandigheden
I	4	0,25	0,94 (\pm 0,07)	normale nieren
II	4	0,5	0,92 (\pm 0,06)	normale nieren
III	5	0,5	0,92 (\pm 0,12)	geïnfecteerde nieren

Figuur III-2. Evenrichtsconcentraties van ampicilline in serum (●—●) en renale lymfe (▲—▲) bij een genarcotiseerde (hypnorm + ether) rat met gezonde nieren gedurende een infuus met 0,25 mg/ml ampicilline in fysiologisch zoutoplossing (infuussnelheid 1,2 ml/uur). Eveneens is weergegeven de per verzamelperiode berekende gemiddelde serumconcentratie (■—■) en de ratio tussen de lymfe en deze gemiddelde serumconcentratie (ratio l/s).



Figuur III-3. Verloop van de serum- (●—●) en lymfe concentratie (▲—▲) van ampicilline na het stoppen van het infuus (0,5 mg/ml ampicilline; infuussnelheid 1,2 ml/uur, looptijd 3 uur) bij een genarcotiseerde (hypnorm + ether) rat met normale nieren. In de figuur zijn de halfwaardetijden ($T_{1/2}$) van ampicilline in serum en lymfe aangegeven.



serumconcentraties en de waarde van de ratio L/S per lymfe verzamelperiode weergegeven. Zowel uit het verloop van de curven als uit de ratio's blijkt dat de ampicilline concentraties zich in beide weefsel-vloeistoffen in evenwicht bevinden. De gemiddelde ratio L/S bedroeg bij dit experiment 0,91.

Om de uitkomsten van de verschillende groepen met elkaar te vergelijken zijn in Tabel III-3 de gemiddelde ratio's L/S per groep weergegeven. Uit deze tabel blijkt dat de ratio's die bij de verschillende groepen werden vastgesteld niet van elkaar verschillen. Hieruit mag geconcludeerd worden dat er een evenredig verband bestaat tussen de serum-, de lymfe- en de infuusconcentratie. Eveneens blijkt hieruit dat de aanwezigheid van een infectie niet van invloed is op de ratio L/S respectievelijk de concentratie ampicilline in de lymfe.

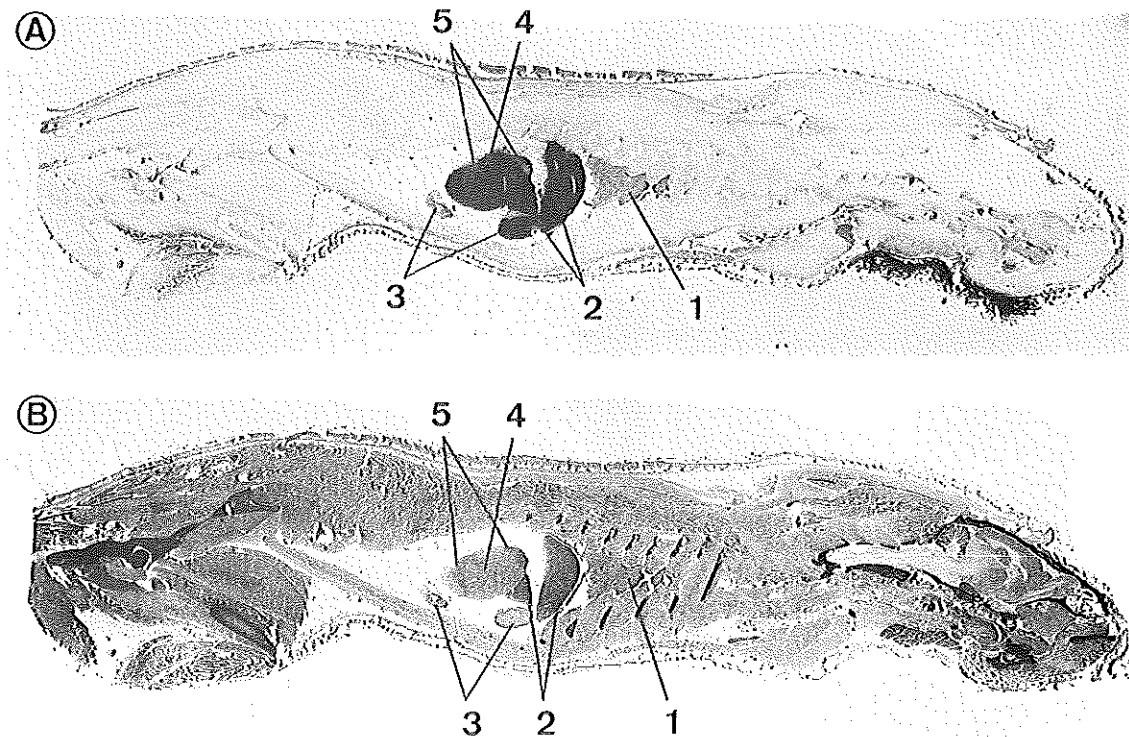
Het verloop van de ampicilline concentratie in serum en lymfe na het stopzetten van het infuus is weergegeven in Figuur III-3. Uit deze figuur valt af te leiden dat in beide weefsel-vloeistoffen de concentratie logaritmisch in de tijd afneemt, maar dat de $T_{\frac{1}{2}}$ waarden voor het ampicilline verschillen. In het serum bedraagt de $T_{\frac{1}{2}}$ circa 50 minuten en in lymfe circa 80 minuten.

Autoradiografie. Bij de bespreking van de resultaten van dit onderzoek wordt eerst aan de hand van foto's van de autoradiogrammen en van de

bijbehorende weefsel-coupes ingegaan op de kwalitatieve waarnemingen. Daarna worden de kwantitatieve gegevens welke werden verkregen uit de metingen van de zwarting van de autoradiogrammen vermeld.

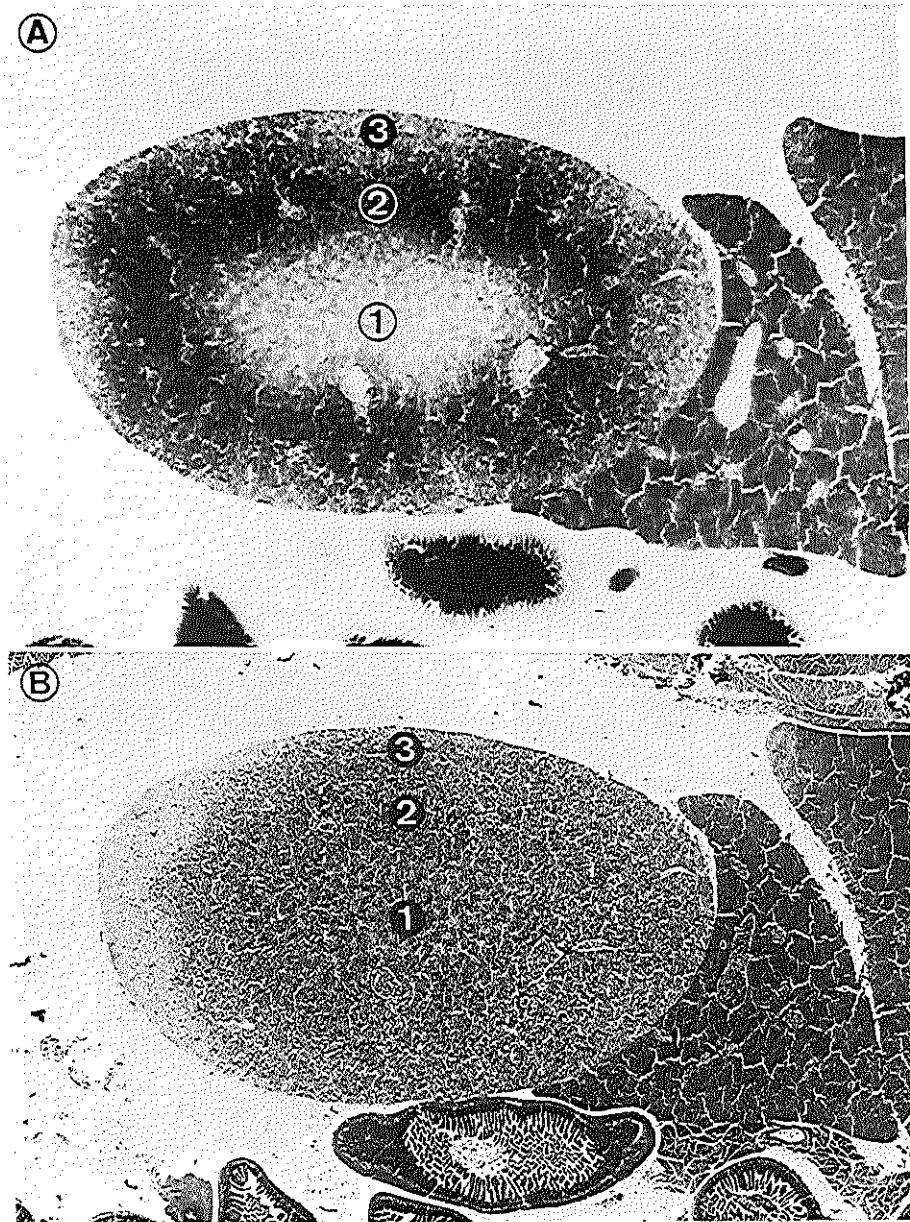
Op de foto's van de autoradiogrammen zijn de plaatsen met een hoog gehalte ampicilline, ten gevolge van de aanwezige radio-activiteit, waar te nemen als grijs tot zwart gekleurde plekken. Ter illustratie zijn de Foto's III-1 A en B opgenomen waarop het autoradiogram (A) en de weefsel-coupe (B) van de gehele rat te zien is. Deze opnamen zijn afkomstig van de rat met een infectie van 4 dagen oud. Op het autoradiogram is waar te nemen dat hoge concentraties ampicilline voorkomen in de lever (2), de darmen (3) en de nier (4) van de rat. Andere opnamen tonen aan dat ook in de blaas ten gevolge van de hoge ampicilline concentratie in de urine veel radio-activiteit voorkomt. De hierna volgende foto's tonen vergrotingen van de autoradiogrammen en de weefsel-coupes waarop centraal de nier is afgebeeld. Steeds wordt het autoradiogram (A) met de bijbehorende weefsel-coupe (B) getoond. Foto's III-2 en III-3 tonen beelden van de normale nier. Op Foto III-2, een doorsnede van de cortex, is waar te nemen dat er een concentratieverschil aanwezig is tussen de medulla (1) en de binnen- (2) en de buitenlaag (3) van de cortex. Foto III-3 toont een doorsnede door de nier waarop zowel de papilla (1), de medulla (2) als de cortex (3) te zien zijn. Het autoradiogram toont dat in de cortex het hoogste gehalte ampicilline voorkomt en dat er tussen de medulla en de papilla sector weinig verschil valt waar te nemen. De afbeeldingen van de Foto's III-4 A en B tonen een coupe van een nier waarin het effect van een 1 dag oude infectie is waar te nemen. Op het autoradiogram is te zien dat de donkere cortex zône (3) aan de linker kant zowel boven als onder (4) een helder gedeelte vertoont. Op deze plaatsen bevinden zich de infectiehaarden. Op de weefsel-coupe is eveneens, zij het minder duidelijk, de aanwezigheid van de infiltraten (4) waar te nemen. Op deze plaatsen ziet men een structuur van de cortex die afwijkt van die van gezond cortex weefsel. Bij de opnamen van de nier met een 4 dagen oude infectie komen de verschillen duidelijker naar voren zoals Foto III-5 B toont. Op deze foto is links onder en rechts van onder naar boven (3) de door de infectie veranderde cortex structuur goed waar te nemen. Het bijbehorende autoradiogram (Foto III-5 A) laat zien dat de infectie nu in nog sterkere mate het gehalte ampicilline heeft verlaagd ten opzichte van de niet geïnfecteerde cortex delen.

Foto III-1. Autoradiogram (A) en coupe (B) van een rat met een geïnfecteerde nier. Infectie: E.coli TO 3; 4 dagen tevoren aangebracht. Infuus: 66 µg/ml ³⁵S-ampicilline; infuussnelheid: 1,2 ml/uur.



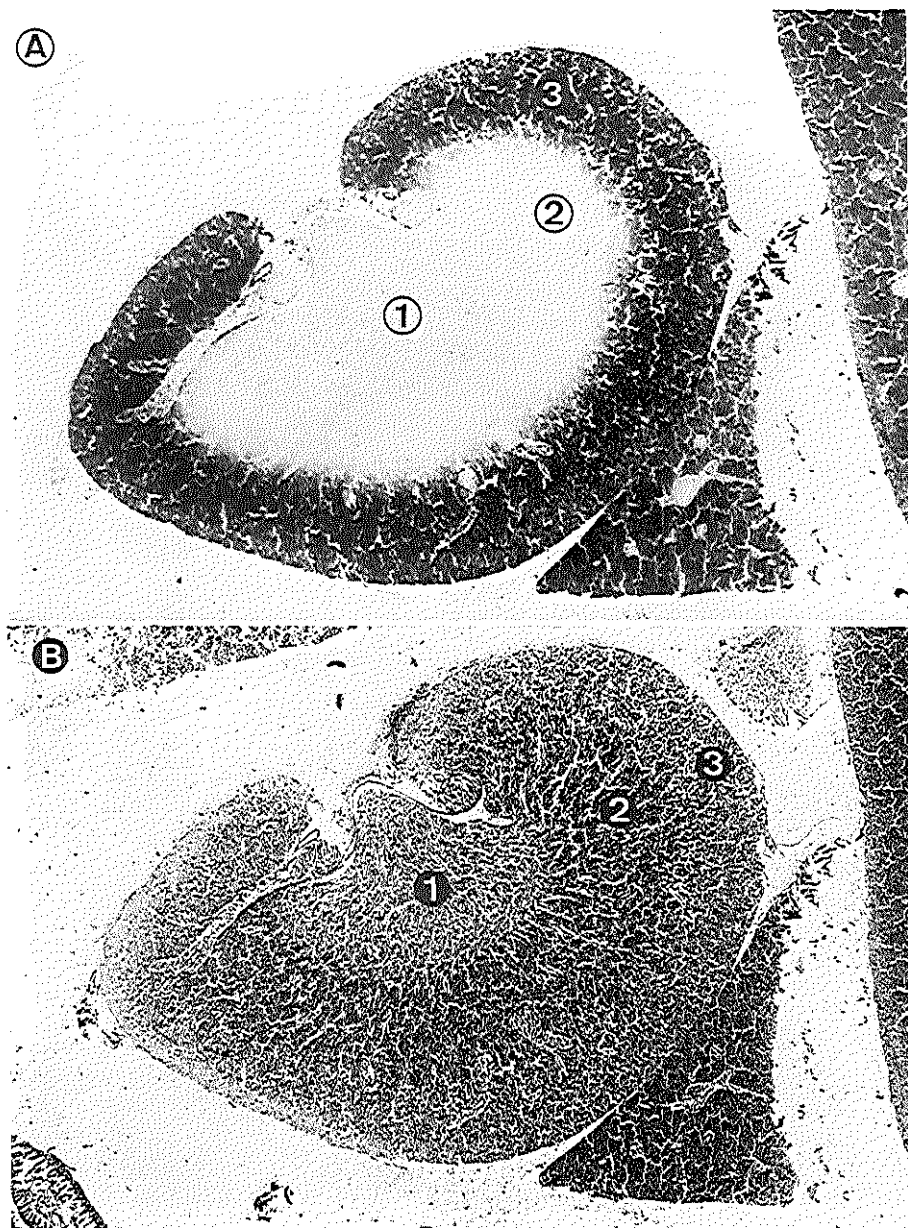
afbeelding op ware grootte; histologische kleuring: hematoxyline - eosine.
1 = long; 2 = lever; 3 = darmen; 4 = nier; 5 = infectiehaard.

Foto III-2. Autoradiogram (A) en coupe (B) van de rechter nier van een
gezonde rat. Doorsnede door de cortex van de nier. Infuus:
132 $\mu\text{g/ml}$ ^{35}S -ampicilline; infuussnelheid: 1,2 ml/uur.



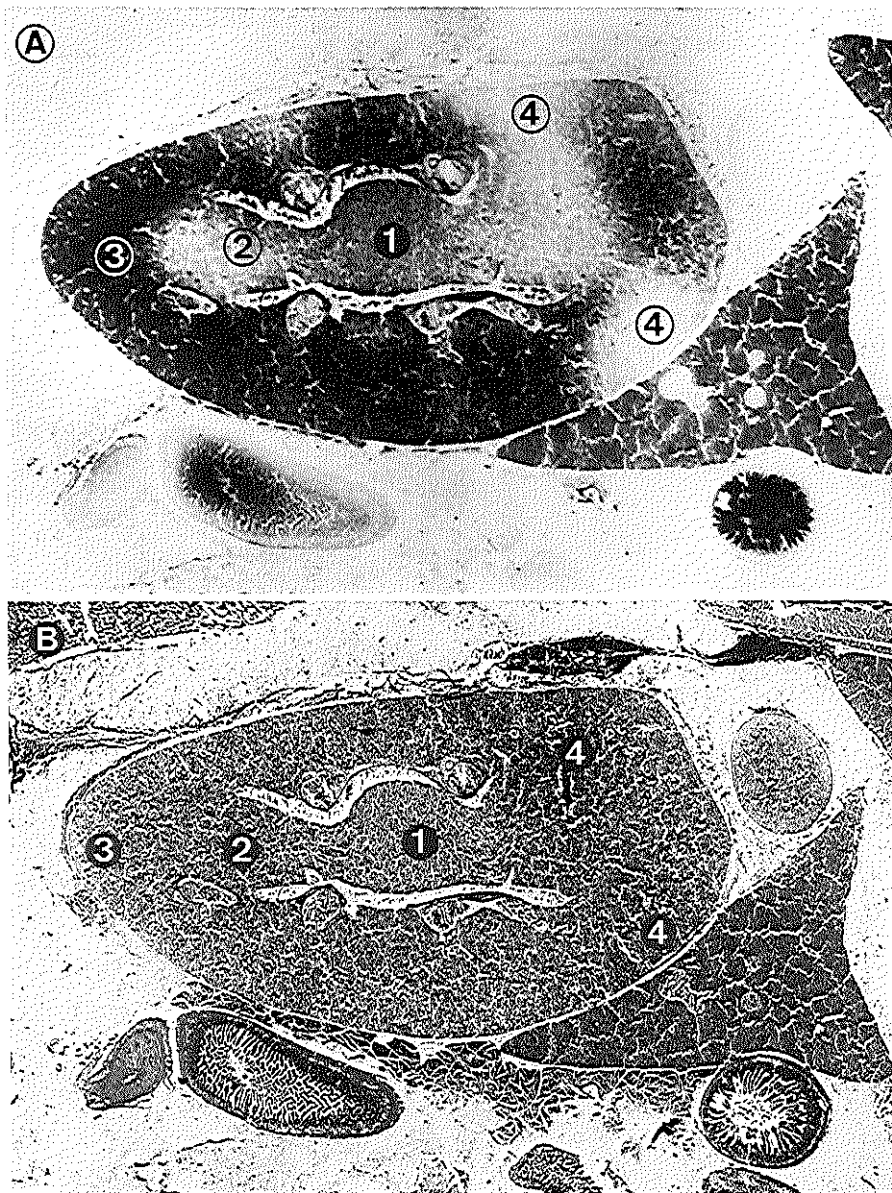
afbeelding 7,5 x vergroot; histologische kleuring: hematoxyline - eosine.
1 = medulla; 2 = cortex (binnenste); 3 = cortex (buitenste).

Foto III-3. Autoradiogram (A) en coupe (B) van de rechter nier van een gezonde rat. Doorsnede door het midden van de nier. Infuus: 132 $\mu\text{g/ml}$ ^{35}S -ampicilline; infuussnelheid: 1,2 ml/uur.



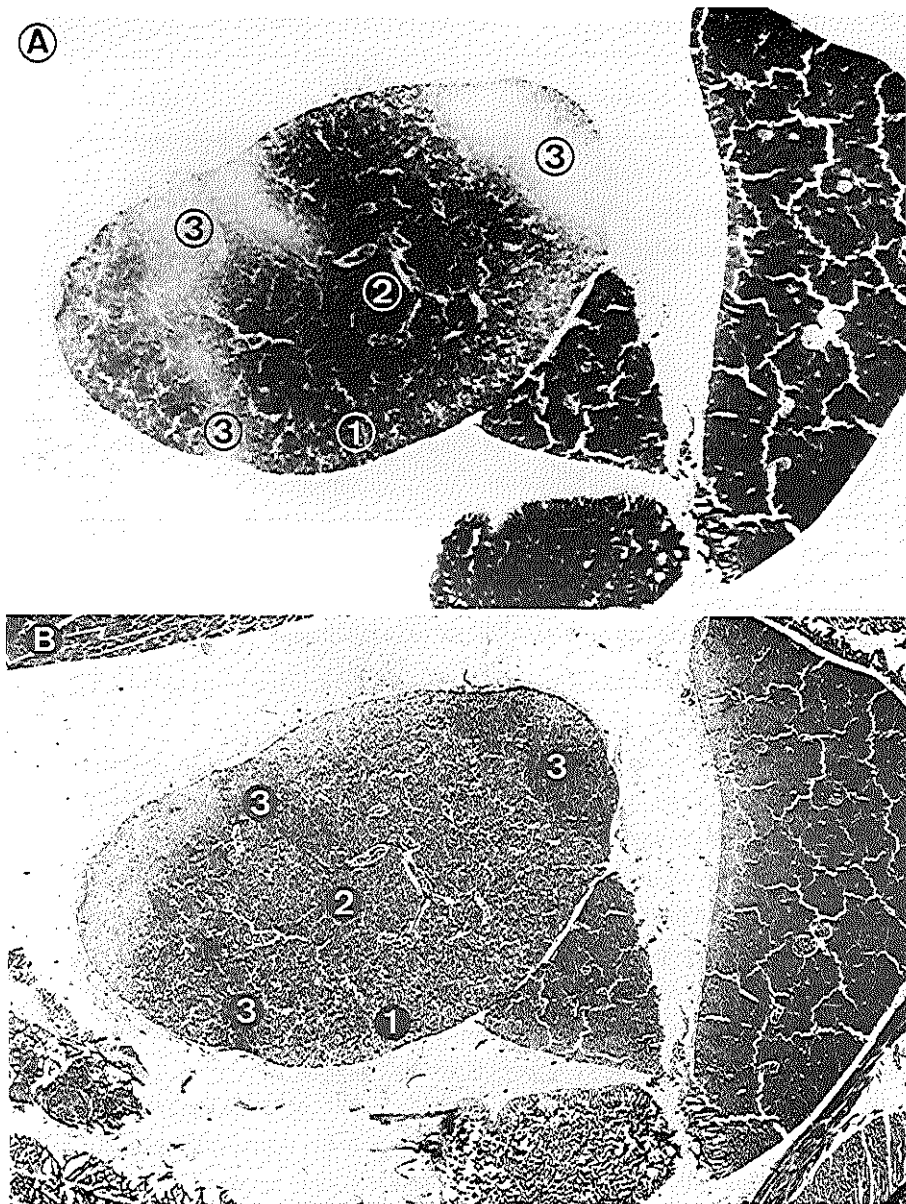
afbeelding 7,0 x vergroot; histologische kleuring: hematoxyline - eosine.
1 = papilla; 2 = medulla; 3 = cortex.

Foto III-4. Autoradiogram (A) en coupe (B) van de rechter nier van een geïnfecteerde rat. Infectie met E.coli T0 3, daags tevoren aangebracht. Doorsnede door het midden van de nier. Infuus: 66 $\mu\text{g/ml}$ ^{35}S -ampicilline; infuussnelheid: 1,2 ml/uur.



afbeelding 7,0 x vergroot; histologische kleuring: hematoxyline - eosine.
1 = papilla; 2 = medulla; 3 = cortex; 4 = infectiehaard.

Foto III-5. Autoradiogram (A) en coupe (B) van de rechter nier van een geïnfecteerde rat. Infectie met E.coli T0 3, vier dagen tevoren aangebracht. Doorsnede door de cortex van de nier. Infuus: $66 \mu\text{g/ml}$ ^{35}S -ampicilline; infuussnelheid: 1,2 ml/uur.



afbeelding 7,5 x vergroot; histologische kleuring: hematoxyline - eosine.
1 = medulla; 2 = cortex; 3 = infectiehaard.

Tabel III-4. De evenwichtsconcentraties ampicilline in de verschillende sectoren van de nier en in het bloed van een rat tijdens een infuus met 132 µg/ml ampicilline opgelost in fysiologisch zout (infuussnelheid 1,2 ml/uur) en de ratio's van de concentraties in de verschillende sectoren van de nier en in het bloed.

ampicilline concentratie			ratio ⁴	
cortex	: 20	µg/g ¹	C/M	: 2
cortex buitenlaag:	18	µg/g ¹	C/P	: 3,5
cortex binnenlaag:	23	µg/g ¹	C/BI	: 5
medulla	: 10	µg/g ¹	M/P	: 1,7
			M/BI	: 2,5
papilla	: 6	µg/g ¹	P/BI	: 1,5
bloed I	: 4	µg/g ¹		
bloed II	: 4,27	µg/ml ²	BIII/BII:	0,48
bloed III	: 2,05	µg/ml ³		

¹ bepaald via kwantitatieve autoradiografie.

² bepaald via een radiochemische bepaling.

³ bepaald via een microbiologische bepaling in het serum, waarna met behulp van de hematocriet waarde werd omgerekend naar de bloedconcentratie.

⁴ C = cortex; M = medulla; P = papilla; BI, II, III = bloed I, II, III.

De resultaten van de kwantitatieve autoradiografie zijn weergegeven in Tabel III-4. In deze tabel zijn eveneens de resultaten opgenomen van de op verschillende wijzen bepaalde concentratie van ampicilline in het bloed van de rat. Uit deze bloedconcentraties blijkt dat de waarde gevonden met de kwantitatieve autoradiografie (4 µg/g) goed overeenstemt met de radiochemisch bepaalde waarde (4,27 µg/ml). De microbiologische bepaling gaf echter een veel lagere bloedconcentratie (2,05 µg/ml) te zien. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het ampicilline voor circa 50% is omgezet in niet biologisch actieve metabolieten.

Door het opmeten en vergelijken van de zwartingen welke voorkomen in de infectiehaarden en in grote bloedvaten op de autoradiogrammen van de geïnfecteerde ratten, kon worden vastgesteld dat in deze gebieden vrijwel dezelfde zwarting voorkwam. Hieruit werd geconcludeerd dat de concentratie ampicilline in de infectiehaarden bij benadering dezelfde is

als die welke voorkomt in het bloed respectievelijk het serum van de rat.

Discussie.

Alvorens in te gaan op een vergelijking van de resultaten van de drie toegepaste methoden zullen enkele bijzonderheden van de afzonderlijke methoden besproken worden.

Ten aanzien van de grote spreiding in de serumconcentraties bij de groepen genarcotiseerde ratten is het volgende op te merken. Uit de resultaten bleek de serum spiegel en de concentratie in cortex weefsel beïnvloed te worden door de narcose. Deze invloed kwam eveneens tot uiting in de halfwaarde tijd van ampicilline in het serum. Het gebruik van ether voor de voortzetting van de initiële hypnorm narcose heeft voor de afzonderlijke ratten geleid tot verschillen in de diepte der narcose. Het is dus aannemelijk dat de spreiding in de serumconcentraties is terug te voeren tot verschillen in de diepte der narcose.

Ten aanzien van de wijze waarop de lymfe werd verkregen dient opgemerkt te worden dat het niet uitgesloten is dat bijmenging van lymfe afkomstig van de achterpoten van de rat heeft plaatsgevonden. Omdat de uitstroomsnelheid van de lymfe een grote overeenkomst vertoonde met de hoeveelheid lymfe die werd opgevangen door Wunderlich e.a., mag worden aangenomen dat deze bijmenging zeer gering is geweest ¹⁶. Deze auteurs vonden bij hun studie bij ratten, waarbij de lymfe rechtstreeks uit de nier werd opgevangen (zie voor methode Wolgast e.a. ¹⁷) een uitstroomsnelheid van gemiddeld 100 µl/uur (40 - 160 µl/uur) terwijl in ons onderzoek gemiddeld 66 µl/uur opgevangen werd.

Uit de experimenten met het radio-actief gemerkte ampicilline bleek dat de concentratie in het bloed, indien deze met behulp van de radio-activiteit werd gemeten, ongeveer tweemaal zo hoog was als de concentratie die gevonden werd als de bepaling langs microbiologische weg werd uitgevoerd. Op grond hiervan kan geconcludeerd worden dat circa 50% van het ampicilline aanwezig is in de vorm van biologisch inactieve metabolieten. Dit percentage komt goed overeen met de waarde die andere onderzoekers vonden bij hun studies naar de uitscheiding van ampicilline in de gal via de lever ^{18,19,20}.

Voor de bepaling van de weefsel-concentraties werden drie methoden toegepast. Een vergelijking van de resultaten die met deze methoden wer-

den verkregen bij ratten met normale nieren leert ons het volgende. Zowel met de homogenaat-bepaling als met kwantitatieve autoradiografie werd aangetoond dat er in de cortex een vijfmaal hogere ampicilline concentratie aanwezig is dan in het serum. Daarentegen bleek uit de analyse van de lymfe dat de concentratie ampicilline in de lymfe iets onder die in het serum ligt. Aannemende dat de concentratie in de lymfe de weefsel-concentratie weerspiegelt lijkt er een discrepantie te bestaan tussen de uitkomsten die met de verschillende methoden werden verkregen. Uit de literatuur is bekend dat enkele antibiotica een sterke binding vertonen met celbestanddelen uit de cortex van de nier. Door Luft en Kleit werd deze binding voor gentamicine aangetoond in de cortex van de rat ²¹. Indien we veronderstellen dat ook ampicilline binding met celbestanddelen in de nier vertoont, dan zou dit een verklaring kunnen inhouden voor de zojuist genoemde discrepantie. Immers, de hoge concentraties, gevonden bij de homogenaat-bepaling en de autoradiografie zijn dan het gevolg van de aanwezigheid van zowel vrij als gebonden ampicilline, terwijl de lage lymfe concentraties het gehalte vrij ampicilline weerspiegelen. Bij dit onderzoek werden twee aanwijzingen gevonden voor de veronderstelde binding van het ampicilline aan cortex weefsel. Uit de analyse van de weefselhomogenaten bleek dat zeer hoge infuus concentraties aanleiding geven tot weefselverzaadiging (groep VI). Terwijl uit het lymfe onderzoek bleek dat de $T_{1/2}$ voor ampicilline in lymfe circa $1\frac{1}{2}$ maal hoger is dan die in serum. Hetgeen wijst op de aanwezigheid van een ampicilline reservoir waaruit de lymfe gevoed wordt.

Fabre e.a. onderzochten de verdeling van ampicilline bij ratten op verschillende tijdstippen na een éénmalige injectie. Zij toonden eveneens aan dat de ampicilline concentraties in de lever, de nieren, de darmen en de urine hoger waren dan in het serum ²². Naber e.a. vonden bij honden een ratio tussen de ampicilline concentraties in renale lymfe en serum van 0,85 ¹⁴. Deze waarde stemt goed overeen met de door ons vastgestelde ratio van 0,92. Whelton e.a. bepaalden ampicilline concentraties in homogenaten van nierweefsel van honden en van de mens ^{15,23}. De door hen en door ons gevonden ratio's tussen de concentraties in de verschillende sectoren van de nier onderling en tussen deze en het serum zijn weergegeven in Tabel III-5. Zoals in de tabel tot uitdrukking komt hebben Whelton e.a. aannemelijk gemaakt dat de toestand waarin de waterhuishouding van het proefdier verkeert van invloed is op de verschillende

Tabel III-5. *Vergelijking van de ratio's tussen de ampicilline concentraties in de nier-sectoren en in het serum van de normale en geïnfecteerde rat met de ratio's welke door Whelton e.a. werden waargenomen in normale nieren bij de hond en normale en geïnfecteerde nieren bij de mens.*

ratio ¹	homogenaat analyse ²	kwantitatieve autoradiografie ²	Whelton e.a. 1971 ³	Whelton e.a. 1972 ⁴
C/M	x	2	1,6-2,5	0,8-2,3
C/P	x	3,5	1,0-2,8	0,8-2,8
M/P	x	1,7	0,6-1,1	1,0-1,2
C/S	5,0	5	3,0-6,2	6,2-9,8
M/S	x	2,5	1,9-2,5	8,1-4,3
P/S	x	1,5	2,3-2,9	7,8-3,6
C inf/S	2,8	1		0,5

¹ C = cortex; M = medulla; P = papilla; S = serum; C inf = infectiehaard in de cortex.

² ratio's waargenomen in dit onderzoek bij ratten; x = niet bepaald.

³ ratio's waargenomen bij honden; de lage waarden behoren bij een zogenaamd overvulde toestand en de hoge waarden bij een uitgedroogde toestand ¹⁵.

⁴ ratio's waargenomen bij de mens ²³, voor lage, hoge waarden zie ³.

ratio's. De in ons onderzoek gebruikte ratten hadden tot vlak voor het experiment de mogelijkheid water ad libitum tot zich te nemen. Uit Tabel III-5 blijkt dat de ratio's redelijk tot goed met elkaar overeenstemmen. Alleen de ratio's waarbij de concentratie in de papilla is betrokken zijn bij ons lager dan de waarden door Whelton e.a. waargenomen. Hiervoor is geen verklaring voorhanden.

Vergelijking van de uitkomsten van de drie methoden die werden gebruikt voor het meten van de verdeling van ampicilline in geïnfecteerde nieren leert ons dat de ratio tussen de concentratie in het geïnfecteerde cortex weefsel en in het serum bij de autoradiografie lager is dan bij de homogenaat-bepaling (Tabel III-5). Daarnaast bleek dat beide ratio's lager zijn dan de ratio voor de normale nier. Daar tegenover staat dat er bij de analyse van lymfe geen verschil in de ratio tussen de concentratie in lymfe en in serum werd gevonden voor normale en geïnfecteerde nieren. Bij de ratio van de homogenaat-bepaling dient opge-

merkt te worden dat de stukjes cortex weefsel voor het maken van het homogenaat zowel uit geïnfecteerd als uit gezond weefsel bestonden. Dit verklaart waarom deze ratio hoger uitvalt dan de ratio die werd verkregen met behulp van autoradiografie. Dat de aanwezigheid van een infectie kan leiden tot een verlaging van het antibioticum gehalte in het nierweefsel is door verschillende auteurs waargenomen ^{12,23,24,25,26}. Uit Tabel III-5 blijkt dat de in ons onderzoek gevonden ratio tussen de concentratie in de geïnfecteerde cortex en in het serum van dezelfde orde van grootte is als door Whelton e.a. werd gevonden bij de mens ²³. De oorzaak van de verminderde ampicilline concentratie op de plaats van de infectie kan niet uit dit onderzoek worden afgeleid. Het is mogelijk dat de bindingsmogelijkheden van de cellen door de infectie zijn aangetast. Ook is het denkbaar dat ampicilline onvoldoende in de haarde kan doordringen omdat deze sterk met cellen is geïnfilteerd.

Uit dit onderzoek blijkt dat de concentratie van ampicilline in de cortex van de normale rattennier vijfmaal hoger is als in het serum. De ampicilline concentratie in een infectiehaard in de cortex van de nier is daarentegen van dezelfde orde als de serumconcentratie. Op grond van deze waarneming wordt in het hierna beschreven onderzoek naar de in-vivo gevoeligheid van *E.coli* voor ampicilline de serumconcentratie van dit middel bij de geïnfecteerde ratten gebruikt als maat voor de corticale weefsel-concentratie.

ONTWIKKELING VAN EEN INFECTIE- EN THERAPIEMODEL.

Inleiding.

Bij de keuze van een infectiemodel dat tevens geschikt is om het effect van de behandeling met een antibioticum te meten, dient met een aantal factoren rekening gehouden te worden. Voorzover deze factoren aan elkaar gekoppeld zijn, kunnen zij een beperking betekenen van de keuzemogelijkheden.

Om een geldige vergelijking tussen de uitkomsten van de in-vivo en de in-vitro experimenten te verkrijgen, werd gekozen voor toediening van het antibioticum via een continu infuus. De hierbij toegepaste techniek werd in Hoofdstuk II beschreven. Omdat toepassing van een continu infuustechniek bij de muis moeilijk uitvoerbaar is, kwam dit dier niet in aanmerking. Om betrouwbare uitspraken te kunnen doen over het therapeutisch effect van een antibioticum moet men over een betrekkelijk groot aantal dieren kunnen beschikken. Als men het effect ten opzichte van verschillende bacteriestammen wil weten dan stijgt het aantal benodigde proefdieren evenredig met het aantal bacteriestammen. Mede met het oog op de financiële en logistieke gevolgen van bovenstaande randvoorwaarden werd uiteindelijk gekozen voor de rat als proefdier.

Voor dit betrekkelijk kleine en goedkope proefdier zijn in de literatuur een aantal infectiemodellen beschreven. Bij de keuze van het model werd opnieuw rekening gehouden met een aantal randvoorwaarden. Om uitspraken over een therapeutisch effect van een antibioticum te mogen verwachten, dient een infectiemodel te worden gekozen waarvan bekend is dat het antibioticum tot de infectiehaard kan doordringen. Daarnaast is het wenselijk dat de infectie beperkt blijft tot één orgaan. De toepassing van een infuustechniek, waardoor het proefdier wordt blootgesteld aan extra spanningen gedurende het experiment, bepaalde dat de infectie niet acuut mocht verlopen en niet mocht leiden tot een

kritieke toestand van het dier. Een model dat aan deze voorwaarden voldeed en waarvan eveneens bekend was dat het bruikbaar is voor antibiotica onderzoek, was het door Burrous en Cawein beschreven pyelonefritis model bij de rat ²⁷. Deze infectie is eenvoudig aan te brengen, verloopt mild, is goed reproduceerbaar, beperkt zich tot de urinewegen en reageert in het algemeen gunstig op toediening van antibiotica. Dit laatste is eenvoudig te meten door telling van het aantal bacteriën dat zich in het geïnfecteerde weefsel bevindt. Een nadeel van dit model werd gevormd door de complexe verdeling van het antibioticum in de nier. De resultaten van het onderzoek naar de intra-renale verdeling van ampicilline werden in Hoofdstuk III beschreven.

Burrous en Cawein gebruikten een *E.coli* stam als infecterend micro-organisme ²⁷. De keuze van de bacteriesoort stond echter nog ter discussie, aangezien dit model ook met andere micro-organismen kan functioneren. Uiteindelijk werd toch gekozen voor *E.coli* omdat deze bacterie weinig pathogeen is voor de mens, *in vitro* makkelijk en reproduceerbaar groeit en *in vitro* makkelijk kan worden gemuteerd. Daarnaast was het goed mogelijk binnen een bestaande collectie van stammen afkomstig uit de kliniek een redelijke variabiliteit in de in-vitro gevoeligheid te vinden.

De laatste keuze, welke gemaakt moest worden, betrof het antibioticum. Wederom stelde hier de toepassing van de infuustechniek zijn eisen: het antibioticum moet goed en zonder interacties oplosbaar zijn in infuusvloeistoffen en dient in deze oplossing een redelijke stabiliteit te bezitten. Daarnaast verdient het de voorkeur een antibioticum te kiezen dat *in vivo* niet al te snel aanleiding geeft tot resistentievorming. Op arbitraire gronden is uiteindelijk gekozen voor ampicilline, een β -lactam antibioticum met bactericide werking.

In de hieronder volgende resultaten wordt nader ingegaan op het verloop en de histologie van de infectie en worden de proefomstandigheden en parameters voor het therapeutisch model beschreven.

Materialen en methoden.

Proefdieren. Vrouwelijke R-stam albino ratten, circa 20 weken oud, gewicht circa 200 g (inteeft stam, gefokt bij het Centraal Proefdieren Bedrijf van de Erasmus Universiteit Rotterdam).

Bacteriën. *E.coli* TO 3 en TO 8. Beide stammen waren afkomstig uit een

collectie klinische isolaten uit het Dijkzigt Ziekenhuis te Rotterdam.

Infectiemodel zonder therapie.

Markering van de bacterie. De in dit onderzoek gebruikte *E.coli* stammen zijn in-vitro gemerkt door ze resistent te maken tegen nalidixinezuur. Deze erfelijke eigenschap werd ingebracht door de bacterie te kweken in buizen nutriënt broth no. 2 (Oxoid) (NB), die toenemende concentraties nalidixinezuur (Negram, Winthrop) bevatten. De maximum concentratie bedroeg 50 µg/ml. Na groei van de spontane mutanten werden deze geïsoleerd door uitplating op Diagnostic Sensitivity Test agar (Oxoid) (DST) met 50 µg/ml nalidixinezuur.

Voorbereiding van de bacterie suspensie. Een overnacht cultuur van *E.coli* in NB werd met behulp van een fotometer (Vitatron, Cenco, Holland) gesteld op een OD van 0,5 bij 700 nm. De gestelde suspensie werd 2 x gewassen met fysiologisch zout (FZ) en vervolgens met FZ 100 x verdund.

Infectie van de rat. De met ether genarcotiseerde ratten werden rechtstreeks via de huid met behulp van een automatische injector (Hamilton) geïnoculeerd met 2 x 0,02 ml van de voorbereide bacterie suspensie. Deze suspensie werd via een vlindernaald (Butterfly 25) in beide polen van de rechter nier ingespoten. Op deze wijze werden in totaal circa 10⁵ kolonie vormende eenheden (CFU) ingespoten.

Bacteriologisch onderzoek. Bij sectie op verschillende tijdstippen werden beide nieren en de blaas van de rat a-septisch verwijderd. De nieren werden vervolgens ontdaan van hun kapsel. Na weging werden de organen gehomogeniseerd in 10 ml FZ met behulp van een homogenisator (MSE). In het homogenaat werd het aantal CFU/ml bepaald door 0,2 ml van een geschikte verdunning van het homogenaat uit te spatelen op DST-agar. Na overnacht bebroeden werden de kolonies geteld en werd het aantal CFU/ml berekend. Om zeer lage aantallen CFU's te bepalen werd een deel van het homogenaat ook verwerkt in een gietplaat (DST-agar). Van de bij de telling geïsoleerde kolonies werd één kolonie afgeënt op DST-agar met 50 µg/ml nalidixinezuur.

Histologie van de nier. Op verschillende tijdstippen tijdens de infectie werden van enkele ratten de nieren verwijderd voor histologisch onderzoek. De nieren werden gefixeerd in 10% formaline, ontwaterd in ethanol en toluol en ingebed in parafine. Na het snijden van coupes werden deze met hematoxyline-eosine gekleurd.

Infectiemodel met therapie.

De hierbij gevolgde procedure is zoals hierboven beschreven aangevuld met de volgende werkwijzen:

Voorbereiding ratten. Circa 7 weken voor het aanbrengen van de infectie werd de infuus-kamer geïmplanteerd (zie Hoofdstuk II). De dag voordat de infectie werd aangebracht werden de ratten onder hypnorm (Duphar) narcose (0,1 ml/100 g) aangesloten op het infuus-systeem.

Antibioticum behandeling. Vierentwintig uur na het aanbrengen van de infectie werd begonnen met het toedienen van ampicilline (Penbritin, Beecham) via het infuus. De infuus-vloeistof werd iedere 24 uur verversst.

Bacteriologisch onderzoek. In de loop van het onderzoek is de technische uitvoering van dit onderzoek gewijzigd. Na weging van de geïnfecteerde nier werd deze gehomogeniseerd in 40 ml FZ met behulp van een homogenisator (Virtis). In het homogenaat werd een levend telling uitgevoerd met behulp van een spiraal plaat maker (Spiral Plate Systems Inc.). De wijzigingen hebben geen invloed op de verkregen resultaten.

Contrôle op resistentievorming. Van de bij de telling geïsoleerde kolonies werd één kolonie afgeënt voor een (op later tijdstip uitgevoerde) bepaling van de minimaal remmende concentratie (MRC) (zie Hoofdstuk VI).

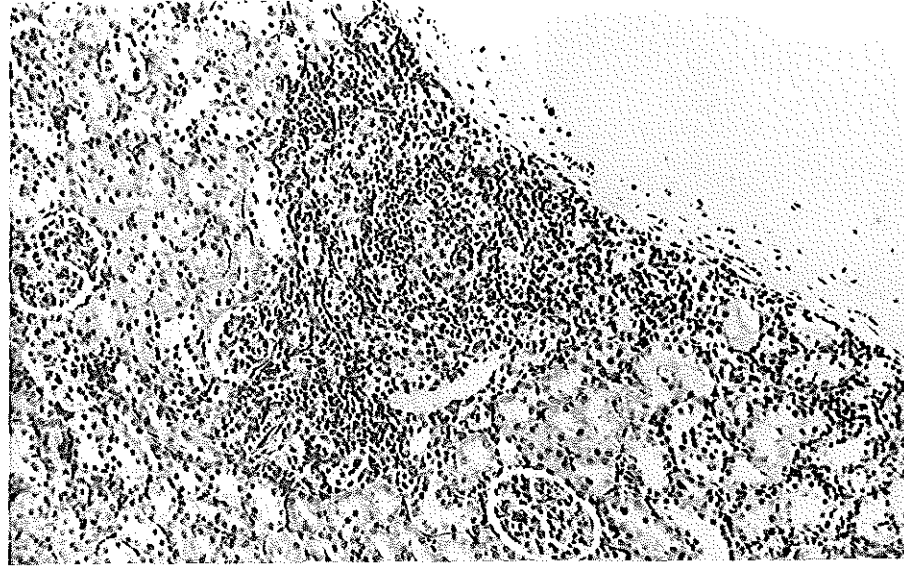
Antibiotica bepaling. Direct voor sectie werd via een hartpunctie bloed van de rat verkregen. In het hiervan verkregen serum werd het gehalte aan ampicilline bepaald via een reeds eerder beschreven microbiologische methode (zie Hoofdstuk II).

Resultaten.

Onderzoek infectiemodel zonder therapie.

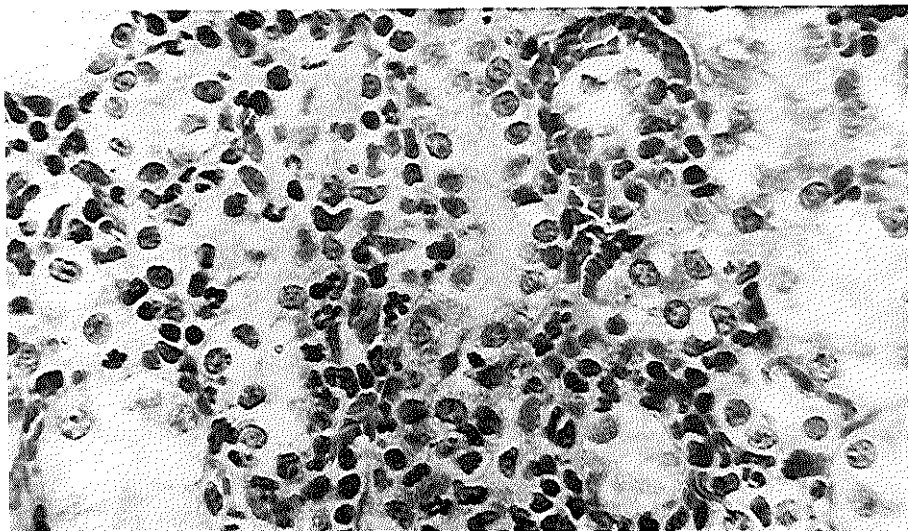
Histologisch onderzoek. Dit onderzoek heeft zich beperkt tot het volgen van de infectie met *E.coli* TO 8 in de rechtstreeks geïnoculeerde rechter nier en in de linker nier van de rat. Preparaten werden vervaardigd van een 8 respectievelijk 22 dagen oude infectie. In zowel de rechter als de linker nier werden infiltraten waargenomen in de cortex en de medulla. Bij de rechter nier waren de infiltraten veelal gesitueerd langs het traject waar de injectienaald in de nier was gestoken, terwijl zij in de linker nier verspreid voorkwamen. Foto IV-1 toont een groot infiltraat aan de rand van de cortex van de rechter nier. Midden in het infiltraat is enige celdisruptie waar te nemen. Op een vergrote

Foto IV-1. *Coupe van de rechter, rechtstreeks geïnoculeerde nier van de rat met een 8 dagen oude infectie met E.coli T0 8. Midden in het beeld is een groot infiltraat aan de rand van de cortex waar te nemen.*



Vergroting 16 x; kleuring met hematoxyline en eosine.

Foto IV-2. Coupe van de rechter, rechtstreeks geïnoculeerde nier van de rat met een 8 dagen oude infectie met *E.coli* TO 8. Het beeld toont de geïnvaseerde lymfocyten en segmentkernige neutrofiele granulocyten.



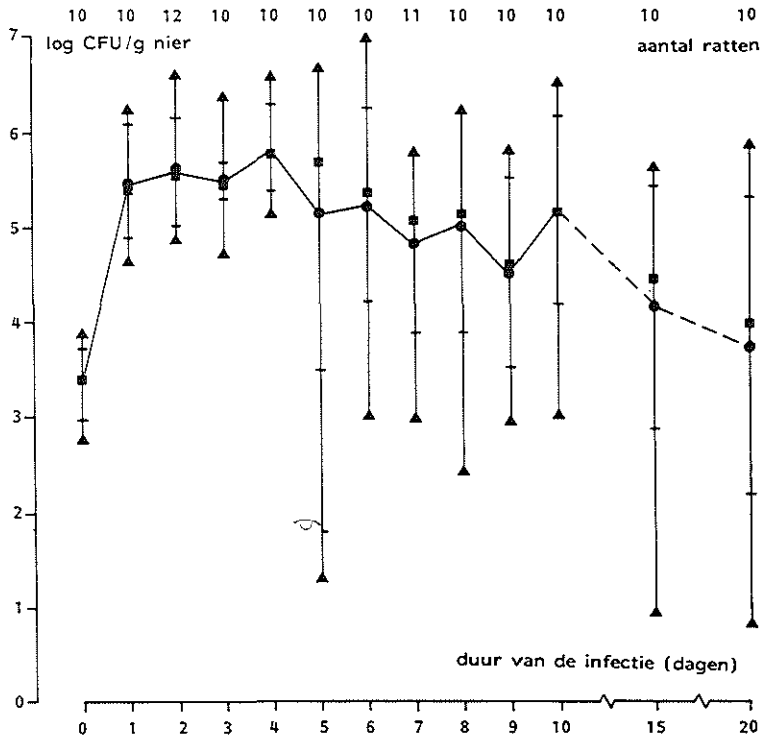
Vergroting 400 x; kleuring met hematoxyline en eosine.

weergave van het infiltraat (Foto IV-2) is waarneembaar dat dit groten-deels uit geïnvaseerde lymfocyten en segmentkernige neutrofiele granulocyten bestaat. De preparaten van de 22 dagen oude infectie ver-toonden de eerste verschijnselen van de schrompeling die kenmerkend is bij een pyelonefritische nier.

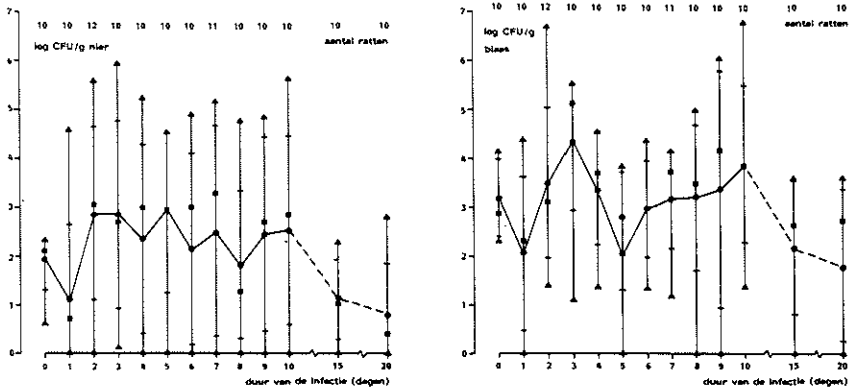
Bacteriologisch onderzoek. Figuren IV-1 en -2 tonen de uitkomsten van het bacteriologisch onderzoek naar het verloop van de infectie door *E.coli* TO 8 in de nieren en de blaas van de rat. Zoals in Hoofdstuk V zal wor-den beschreven valt deze stam qua virulentie in groep II, dat wil zeg-gen dat deze stam nier-pathogeen is. Omdat het inoculum niet operatief maar via de huid in beide polen van de nier werd ingespoten was de kans aanwezig dat het orgaan onvolledig werd aangeprikt. Dit kan aanleiding geven tot uitschieters met lage aantallen CFU/g nier. Om de invloed hiervan uit te laten komen, is in de figuren zowel het gemiddelde en de standaard deviatie (SD) als de mediaan en het bereik weergegeven.

In Figuur IV-1 wordt het verloop van de infectie in de geïnoculeerde, rechter nier weergegeven aan de hand van de gevonden aantallen CFU/g nier. Het blijkt, dat de infectie reeds na 24 uur is gestabiliseerd en

Figuur IV-1. Het verloop van de infectie met *E.coli* TO 8 in de rechter, rechtstreeks geïnoculeerde nier van de rat.



Figuur IV-2. Het verloop van de infectie met *E.coli* TO 8 in de linker nier (links) en de blaas (rechts) van de rat.



- = mediaan van de uitkomsten voor het vermelde aantal ratten.
- = gemiddelde van de uitkomsten voor het vermelde aantal ratten.
- = standaard deviatie van het gemiddelde.
- ▲ = het bereik van de waargenomen uitkomsten.

gedurende 3 à 4 dagen op hetzelfde niveau gehandhaafd blijft. In de daarop volgende periode is te zien dat de infectie langzaam afneemt, echter zonder dat er in een waarnemingsperiode van 20 dagen sprake is van een spontane genezing. Vanaf dag 5 neemt de spreiding van het aantal CFU/g nier toe. Eveneens valt op dat de mediaan in de meeste gevallen boven het gemiddelde ligt.

Figuur IV-2 toont het verloop van de infectie in de niet geïnoculeerde, linker nier en de blaas. Duidelijk blijkt dat de contra-laterale nier door de toegepaste techniek in de meeste gevallen eveneens wordt geïnfecteerd. Het beeld van de infectie in deze nier is echter weinig consistent en vertoont vanaf het begin zeer grote spreidingen in de resultaten. Zowel de mediaan als het gemiddelde van de aantallen CFU/g nier liggen beduidend lager dan het geval was bij de rechter nier. Tenslotte toont het verloop van het aantal CFU/g blaas, dat ook dit orgaan een weinig consistent beeld vertoont met sterk wisselende aantallen CFU.

De gewichten van de nieren varieerden tussen 0,8 en 1,1 g, terwijl de blaas meestal een gewicht had van circa 0,07 g. De uit de homogenaten geïsoleerde *E.coli*'s waren zonder uitzondering resistent tegen nalidixine-zuur. Sporadisch werd een menginfectie vastgesteld. In deze gevallen behoorde het tweede micro-organisme steeds tot een andere soort.

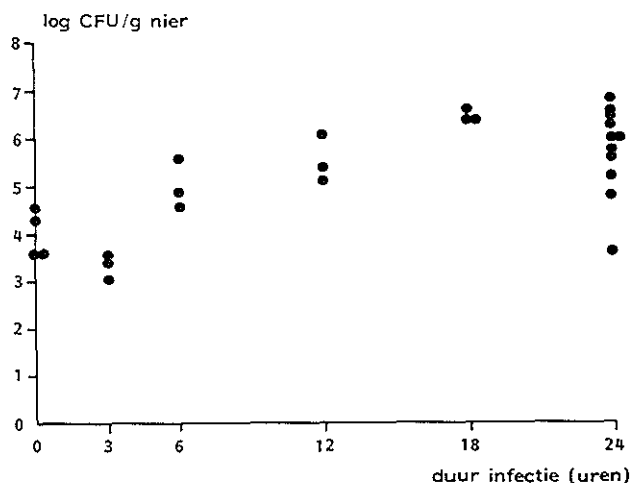
Om te onderzoeken of er correlaties aanwezig waren tussen de infectiegraden van beide nieren en de blaas werden de rang correlatiecoëfficiënten van Spearman berekend. Uit de waarden van deze coëfficiënten kon worden opgemaakt dat er geen enkel verband is tussen de aantallen CFU/g orgaan van de rechter en de linker nier. Tussen de aantallen CFU/g orgaan van de nieren en de blaas bleek op enkele dagen een redelijk verband aanwezig te zijn (coëfficiënten tussen 0,70 en 0,90), terwijl andere dagen een zeer slechte correlatie vertoonden.

In een later stadium van het onderzoek is onderzocht of de resultaten voor een a-virulente stam en een virulente stam verschilden van de uitkomsten van deze nier-pathogene stam. De resultaten hiervan leverden een identiek beeld op voor het verloop van de infectie.

Onderzoek infectiemodel met therapie.

Begin tijdstip van de therapie. Aangezien besloten was de therapie te starten nadat de infectie volledig was aangeslagen, werd nagegaan wat het verloop van het aantal CFU van *E.coli* stam TO 3 in de rechter nier was in de eerste 24 uur na insputing. Hiertoe werd in deze periode bij

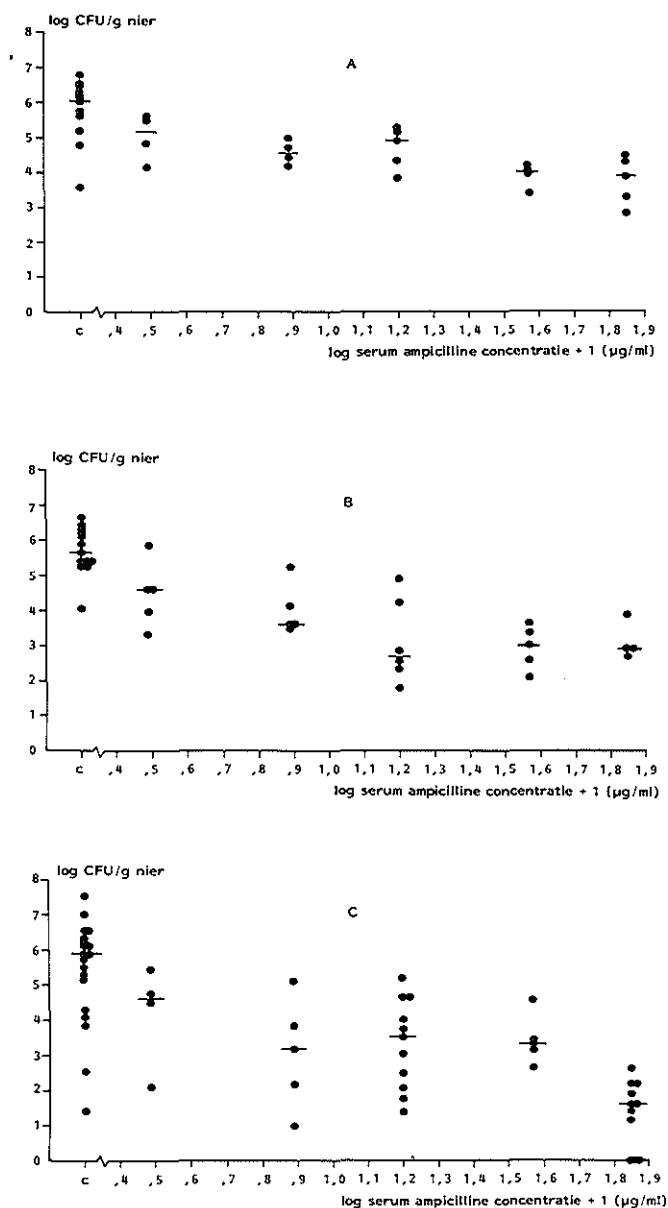
Figuur IV-3. Het verloop van de infectie met *E.coli* TO 3 in de rechter, rechtstreeks geïnoculeerde nier gedurende de eerste 24 uur van de infectie. Iedere punt geeft de uitkomst van één rat weer.



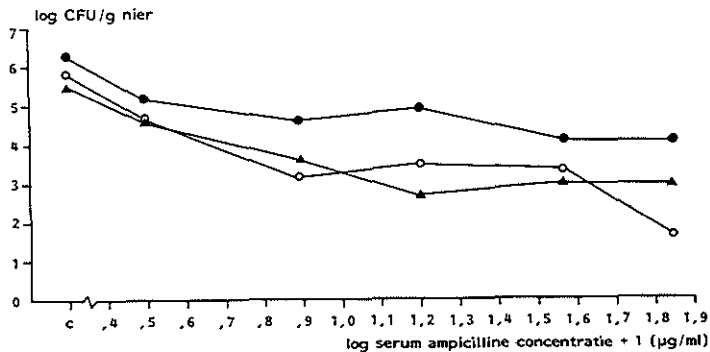
telkens 3 tot 6 ratten om de 3 uur het aantal CFU in de rechter nier bepaald. Uit Figuur IV-3 blijkt, dat het aantal CFU na de insputing eerst afneemt. Na 3 uur wordt een dal waargenomen waarna de aantallen sterk toenemen. Omdat het aantal CFU 18 uur na de insputing een stabiele waarde bereikte werd besloten de therapie 24 uur na de insputing te starten.

Onderzoek naar de therapieduur. Om na te gaan of het mogelijk was de dieren volledig te genezen met, ook in de humane geneeskunde, gangbare ampicilline spiegels werd een kort vooronderzoek verricht. Hierbij bleek dat volledige genezing alleen kon worden bereikt wanneer de behandeling tenminste 7 dagen werd voortgezet. Omdat dit technisch niet haalbaar was, werd besloten het effect van de therapie na minder langdurige behandeling te bestuderen. In Figuur IV-4 zijn de resultaten van een toenemende ampicilline serumconcentratie op de infectie van de rechter nier met *E.coli* TO 3 weergegeven bij een therapieduur van respectievelijk 2 (A), 3 (B), en 4 (C) dagen. Uit de figuur blijkt dat bij elke onderzochte therapieduur, zoals te verwachten was, het aantal CFU/g nier bij hogere serum spiegels afneemt. Figuur IV-5 toont het verloop van de mediane uitkomsten van de aantallen CFU/g nier bij de 3 toegepaste therapieën met toenemende serumconcentraties ampicilline. Uit deze figuur valt af

Figuur IV-4. Het verband tussen de aantallen CFU/g nier van de rechter nier met een infectie van *E.coli* TO 3 na 2 (A), 3 (B) en 4 (C) dagen therapie en de evenwichtconcentratie ampicilline in het serum. Iedere punt geeft de uitkomst van één rat weer; - = de mediaan van een therapiegroep en c = de ratten van de controle groep zonder therapie.



Figuur IV-5. Het verband tussen de mediane waarden van de uitkomsten van de aantallen CFU/g nier van de rechter nier met een infectie van *E.coli* TO 3 na 2 (), 3 () en 4 () dagen therapie en de evenwichtsconcentratie ampicilline in het serum.



te leiden dat bij verlenging van de duur van de behandeling het aantal overlevende bacteriën afneemt. De verschillen tussen 2, 3 of 4 dagen therapie zijn echter niet erg groot. Figuur IV-4 C toont nog een ander fenomeen waarmee rekening dient te worden gehouden, namelijk dat de toenemende spreiding welke reeds bij de controle dieren werd waargenomen ook een rol van betekenis speelt bij de behandelde dieren. Op basis van de waargenomen resultaten werd besloten de therapieduur te beperken tot 3 dagen.

Onderzoek naar het infectieverloop bij de controle dieren. Gezien de speciale maatregelen, welke bij toepassing van de infuustechniek genomen moeten worden, is onderzocht of het gebruik van controle dieren zonder placebo infuus mogelijk was. Hiertoe werd onderzocht of de aantallen CFU/g nier bij ratten zonder infuus na 4 dagen infectie afweken van de aantallen welke bepaald werden bij ratten welke een fysiologisch zout infuus gedurende 3 dagen kregen. Het al of niet ontvangen van dit infuus bleek geen invloed te hebben op het aantal CFU/g nier, zodat besloten werd de controle dieren geen infuus toe te dienen.

Vaststelling van de in-vivo gevoeligheidsparameter. Nadat de proefomstandigheden in het therapiemodel waren vastgelegd: start infuus na 24 uur en duur van het infuus 3 dagen, moest besloten worden op welke wijze een parameter voor de in-vivo gevoeligheid gedefinieerd moest worden. Als maat voor het effect van de therapie werd gekozen voor het

verschil in CFU/g nier dat gekweekt werd uit de behandelde en onbehandelde ratten. Een keuze moest worden gemaakt tussen een groot effect bij hoge concentraties danwel een klein effect bij lage concentraties. Gekozen werd voor een klein effect bij lage concentraties. De in-vivo parameter voor de gevoeligheid werd nu als volgt gedefinieerd: de minimale concentratie, die gedurende 3 dagen in het serum van de therapie dieren aanwezig dient te zijn om een reductie van 90% in de mediane uitkomst voor het aantal CFU/g nier van de therapie groep ten opzichte van de mediaan voor de controle groep te bereiken.

Optreden van resistentie. Steekproefsgewijs onderzoek naar de MRC van *E.coli*'s geïsoleerd uit de homogenaten van nierweefsels, leerde dat tijdens de behandeling zelden resistentievorming tegen ampicilline optrad. Gedurende het gehele onderzoek werd bij slechts 3 kolonies een verminderde gevoeligheid voor ampicilline gevonden.

Berekening gemiddelde serumconcentratie bij de therapie dieren. Van elke rat, die therapie ontving werd de serumconcentratie bepaald. Voor iedere bestudeerde *E.coli* stam werden enkele therapie groepen met verschillende infuus concentraties behandeld om die therapiegroep te vinden welke de vereiste 90% reductie in de mediaan van het aantal CFU/g nier vertoonde. In eerste instantie werd dus een infuus concentratie bepaald waarbij deze reductie optrad. Vervolgens werd deze infuus concentratie vervangen door de serumconcentratie die in de ratten bereikt werd. De serumconcentratie is echter niet alleen afhankelijk van de infuus concentratie maar kan ook per individuele rat verschillen. Aangezien iedere therapie groep uit tenminste 5 ratten bestond, werden dus ook 5 serumconcentraties bepaald. Het was nu mogelijk voor de serumconcentratie van de therapie groep het gemiddelde van deze 5 concentraties te berekenen. Op deze wijze wordt echter een schijnnaauwkeurigheid aan deze groepsconcentratie gegeven. Aangezien de minimaal remmende concentraties voor de bestudeerde *E.coli* stammen alle relatief laag zijn, namelijk kleiner dan 7 µg/ml (zie Hoofdstuk VI), mag aangenomen worden dat geen der stammen in zodanige mate penicillinases vormt dat de vrijkomende penicillinases de serumconcentratie zouden beïnvloeden. Gezien deze aanname en omdat de frequentieverdeling van de serumconcentraties van alle ratten, die een bepaalde infuus concentratie kregen toegediend een normale verdeling vertoonde, werd besloten een gemiddelde serumconcentratie te berekenen op basis van de serumconcentraties per infuus concentratie. Tabel IV-1

Tabel IV-1. Het verband tussen de concentratie ampicilline in de infuus-oplossing en de gemiddelde ampicilline concentratie in het serum van de rat.

infuus concentratie ($\mu\text{g/ml}$)	aantal ratten	gemiddelde serumconcentratie met SD ($\mu\text{g/ml}$)	variatie coëfficiënt (%)
78	30	0,015 \pm 0,002	13,3
156	45	0,024 \pm 0,005	20,8
312	58	0,059 \pm 0,027	45,7
625	85	0,13 \pm 0,02	16,5
1250	106	0,28 \pm 0,075	26,8
2500	100	0,61 \pm 0,18	29,5
5000	69	1,47 \pm 0,18	12,6
10.000	23	3,47 \pm 0,47	13,5

toont de op deze wijze verkregen gemiddelde waarden en de bijbehorende standaard deviaties. Eveneens is in deze tabel de variatie coëfficiënt en het aantal ratten aangegeven, waarmee het gemiddelde werd berekend. De variatie coëfficiënten (CV) welke gevonden werden bij de verschillende infuus concentraties (Tabel IV-1) varieerden tussen de 12% en 30%. Alleen bij de infuus concentratie van 312 $\mu\text{g/ml}$ werd een CV van 45% gevonden. Deze hoge CV waarde is opgetreden omdat de serumconcentratie bij deze infuus concentratie in een vroeg stadium der studie bepaald werd met een *S.aureus* stam als indicator-organisme. De gevoeligheid van deze stam bleek echter niet geschikt voor deze en lagere concentraties. In een later stadium van het onderzoek is voor deze concentraties een *B.calidolactis* stam als indicator-organisme gebruikt.

Discussie.

Het onderzoek naar het verloop van de experimentele nier-infectie bij de rat zonder therapie is uitgevoerd om vertrouwd te raken met het model en om na te gaan welke parameters in geval van therapie bruikbaar zouden zijn voor evaluatie.

De resultaten bevestigden de door Burrous en Cawein verkregen uitkomsten. De infectie is eenvoudig aan te brengen, verloopt mild, waar-

bij het dier in redelijke conditie blijft en levert een reproduceerbaar resultaat ²⁷. De parameter die werd gekozen om het verloop van de infectie te volgen, namelijk het aantal CFU/g nier op verschillende tijdstippen, blijkt bruikbaar te zijn. Doordat echter de inspuiting blind geschiedt, moet er rekening mee worden gehouden, dat er uitbijters zullen voorkomen die zich onderscheiden door lage aantallen CFU/g nier. Om dit probleem aan te pakken werd besloten om de dieren die bij macroscopische beschouwing van de nier bij de sectie geen tekenen van inspuiting c.q. infectie vertoonden te merken en deze uit het experiment te verwijderen indien ook de bacteriologische kweek steriel bleek te zijn. Daarnaast is besloten in het vervolg-onderzoek te werken met de mediaan in plaats van met het gemiddelde om de invloed van de optredende scheve verdeling te compenseren. Zoals in de resultaten reeds werd vermeld, ligt de mediaan vrijwel altijd boven het gevonden gemiddelde. Uit het bacteriologisch onderzoek bleek eveneens dat de nier aan de contralaterale zijde van de infectie vrijwel altijd mee-geïnfecteerd werd. Waarschijnlijk komt deze infectie niet langs hematogene weg maar via reflux in het urineweg-systeem tot stand. Inoculatie van de rat via de hematogene route geeft namelijk alleen aanleiding tot infectie indien gelijktijdig ferritine wordt toegevoegd (persoonlijke mededeling Dr.K.Comber).

Het histologisch onderzoek heeft aangetoond dat het beeld van de verkregen infectie sterke gelijkenis vertoont met dat van de humane chronische pyelonefritis (persoonlijke mededeling Drs.F.J.W.ten Kate). Hierbij dient echter vermeld te worden dat de gevonden infectiehaarden in de rechter nier zich met name concentreren rondom het insteekkanaal van de naald. De geringe abcesvormingen binnen de infiltraten vestigden de verwachting, dat het antibioticum in staat zou zijn de infectie te bereiken (zie ook Hoofdstuk III).

Bij het vervolgen van het lot van de ingespoten bacteriën kwam naar voren dat de infectie ongeveer 18 uur nodig heeft om tot ontwikkeling te komen. Aangezien wij de therapie pas wilden instellen op een tijdstip dat de infectie volledig was aangeslagen, is besloten de aanvangstijd van de behandeling te stellen op 24 uur na inoculatie. Uit literatuurgegevens was reeds bekend, dat volledige genezing alleen kan worden bereikt na langdurige therapie ^{28,29,30,31}. Een kort vooronderzoek bevestigde dat dit ook geldt wanneer de therapie via een infuus continu wordt

toegediend. Om alle dieren binnen een groep volledig te genezen moet de behandeling gedurende tenminste 7 dagen worden voortgezet. In Hoofdstuk II werd beschreven dat een infuus met een looptijd van 7 dagen haalbaar is. In de praktijk blijkt echter het aantal storingen gedurende deze tijd wel toe te nemen. Om het aantal uitvallers te minimaliseren werd daarom besloten de infuusduur op maximaal 4 dagen te stellen. Omdat de infectie binnen zo'n korte tijd bij in de humane geneeskunde gangbare serumconcentraties niet te genezen is, werd een reductie van het aantal CFU/g nier gekozen als parameter voor de evaluatie van het verloop van de infectie.

Waarschijnlijk als gevolg van het in werking treden van de afweer van de gastheer zien we zowel bij de controle- als de therapie-dieren een toegenomen spreiding in het aantal CFU/g nier vanaf dag 5 van de infectie. Met dit verschijnsel rekening houdend en op grond van het geringe verschil tussen 3 en 4 dagen therapie werd besloten het effect van de therapie na 3 dagen te evalueren.

De na te streven reductie in het aantal CFU/g nier van de therapie groep ten opzichte van de controle groep werd op arbitraire gronden vastgesteld op 90%. Gezien de spreiding en de scheve verdeling die optreedt in de aantallen CFU/g nier bij zowel de controle- als de therapie-dieren werd besloten van beide groepen de mediaan als parameter voor de groep te nemen.

Zoals reeds bij de resultaten werd vermeld, zou het berekenen van een gemiddelde serumconcentratie per therapie groep voor iedere *E.coli* stam leiden tot een schijnnaauwkeurigheid. Door de serumconcentraties van alle ratten uit alle therapie groepen, die éénzelfde infuus concentratie kregen toegediend, tesamen te nemen en op basis hiervan een gemiddelde serumconcentratie te berekenen, werd deze schijnnaauwkeurigheid vermeden.

Op basis van het weinig consistente beeld van het infectieverloop in de linker nier en de blaas werd besloten in het therapie-model alleen de resultaten van de rechter nier in het onderzoek op te nemen.

Aangezien in Hoofdstuk III werd aangetoond dat de serumconcentratie een goede benadering geeft van de concentratie op de plaats van de infectie in de cortex van de nier, is de in dit hoofdstuk voorgestelde serumconcentratie leidend tot de gestelde reductie in het aantal CFU/g nier van de therapie groep ten opzichte van de controle groep als in-vivo gevoeligheidsparameter alleszins aanvaardbaar. Deze parameter

zal in het verdere verloop van deze studie worden aangeduid als de minimaal effectieve concentratie (MEC). Op basis van het voorgaande kan de volgende definitie voor de MEC worden gehanteerd:

De minimaal effectieve concentratie is de concentratie die gedurende 3 dagen in het serum van de therapie dieren aanwezig moet zijn om een reductie van 90% te bewerkstelligen in de mediane uitkomst voor het aantal CFU/g nier van de therapie groep ten opzichte van de mediaan voor de controle groep. De therapie dient hierbij 24 uur na het ontstaan van de infectie aan te vangen.

ONDERZOEK NAAR DE RELATIE TUSSEN DE VIRULENTIE VAN *E.COLI* EN DE IN-VIVO
GEVOELIGHEID VAN *E.COLI* VOOR AMPICILLINE.

Inleiding.

Bij de behandeling van infecties wordt de in-vivo gevoeligheid van de bacterie niet alleen bepaald door de werking van het antibioticum maar ook door de afweer van de gastheer. De in Hoofdstuk IV gedefiniëerde MEC waarde is dus de resultante van de beide tegen de bacterie gerichte werkingsmechanismen. Aangezien het effect van de afweer van de gastheer afhangt van de virulentie van de bacterie wordt in dit hoofdstuk onderzocht of er een relatie aanwezig is tussen de MEC waarde en de virulentie van de *E.coli* stammen.

Urineweg infecties worden vaak veroorzaakt door *E.coli* bacteriën. Van-
daar dat de virulentiegraad van stammen geïsoleerd bij deze infecties
veelvuldig is onderzocht (zie voor overzicht: Van den Bosch ³²). In
het algemeen treedt infectie op met bacteriën afkomstig uit de eigen
darmflora, die via de urethra opstijgen in de urinewegen. Ten aanzien
van de aard van de infecterende *E.coli* stammen wordt een tweetal theo-
rieën aangevoerd. De prevalentie theorie gaat ervan uit dat de in de
feces meest voorkomende *E.coli* stam de grootste kans heeft om de urine-
wegen te infecteren. De pathogeniteits theorie gaat ervan uit dat ook het
bezit van bepaalde eigenschappen een verhoogde kans op infectie geeft.
Deze eigenschappen, virulentie factoren, stellen de *E.coli* bacterie in
staat de urinewegen binnen te dringen en zich aldaar te vermenigvuldigen.

Door verschillende onderzoekers zijn correlaties gevonden tussen de
nefro-pathogeniteit en virulentie factoren van bepaalde *E.coli* stammen,
zoals het serotype ³³, de aanwezigheid en de hoeveelheid aanwezig
K antigeen, de gevoeligheid voor serum en fagocytose ³⁴, de hemolyse ³⁵,
de adhesie ³⁶, de dulcitol fermentatie ³⁷ en de groei in urine ³⁸.

Bij het virulentie-onderzoek dat in dit hoofdstuk wordt beschreven
zijn de volgende eigenschappen van de *E.coli* stammen onderzocht:

- het verloop van het bacteriegetal in de nier van de muis na een i.v. injectie van *E.coli* bacteriën,
- het tijdstip van sterfte van de muis na een i.v. injectie met *E.coli* bacteriën,
- de productie van hemolytische enzymen,
- het hemagglutinatiëpatroon,
- de serotypen van de *E.coli* stammen.

Bekeken zal worden in hoeverre deze eigenschappen bij de nier-infectie in de rat een rol spelen en welke relaties met de MEC waarden van de *E.coli* stammen gelegd kunnen worden.

Materialen en methoden.

Therapiemodel bij de rat. Voor de gebruikte materialen en methoden van het therapiemodel wordt verwezen naar Hoofdstuk III.

Bacteriën. *E.coli* stammen uit de verzameling klinische isolaten uit het Dijkzigt Ziekenhuis te Rotterdam en uit de verzameling van Dr.J.F.van den Bosch te Amsterdam.

Virulentie-onderzoek.

Dit onderzoek werd verricht door Dr.J.F.van den Bosch van de afdeling medische microbiologie van de Vrije Universiteit te Amsterdam. Hij maakte daarbij van de volgende procedures gebruik:

Virulentietest. De virulentie van de stammen werd bepaald met behulp van een muizen-model zoals beschreven door Van den Bosch e.a. ³⁹. Daarbij wordt gedurende een periode van 8 uur volgend op een i.v. injectie van $2,5 \times 10^8$ bacteriën (log fase cellen) het verloop van het aantal CFU in de muizennier vastgesteld. Voor iedere *E.coli* stam werden 10 muizen ingespoten. Als a-virulent (groep I) werden stammen aangemerkt die gedurende deze tijdsduur lage aantallen CFU in de nier vertoonden. Virulente stammen (groep III) vertoonden vanaf de toediening hoge aantallen CFU in de nier. De stammen die na een aanvankelijke afname een toename van het aantal CFU in de nier vertoonden, werden als nefro-pathogene stammen (groep II) aangemerkt.

Bij iedere test werden 2 muizen extra ingespoten om de overlevingsduur van de muizen na inspuiting van het inoculum te bepalen. Het tijdstip van sterfte wordt in uren/dagen weergegeven.

Bepaling van hemolysine productie. Hemolysine productie werd bepaald op gewassen bloed agar platen ⁴⁰. De productie wordt weergegeven met

-, +, ++, of +++ (- = geen lysis, + = lysis, alleen direct onder de kolonie, ++ = een kleine zône van lysis rond de kolonie, +++ = een grote zône van lysis rond de kolonie).

Bepaling van het hemagglutinatiëpatroon. Bepaald werd of de stammen hemagglutinatatie vertoonden met cavia en humane groep A erythrocyten.

In geval hemagglutinatatie optrad, werd bekeken of deze gevoelig was voor mannose. De methodiek is beschreven door Van den Bosch e.a. ⁴¹.

Bepaling van het serotype. De stammen werden op de aanwezigheid van O en K antigenen onderzocht door het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Bilthoven.

Resultaten.

De resultaten van het virulentie-onderzoek en de serotypering zijn vermeld in Tabel V-1. De indeling in virulentie groepen wordt vermeld in kolom 2. Deze indeling is gebaseerd op de uitkomsten van het verloop van de aantallen CFU per nier in de muis gedurende 8 uur na een i.v. injectie. De verdeling der *E.coli* stammen over de groepen is met opzet gekozen om de invloed van de virulentie op de MEC waarde te kunnen onderzoeken. In kolom 3 van Tabel V-1 is het tijdstip van sterfte van de muizen na de i.v. toediening van de *E.coli* stammen weergegeven. Behalve stam TO 19 hebben de stammen van groep I geen sterfte van de muizen tot gevolg. De beide stammen van groep II doden de muizen na 1 - 4 dagen, respectievelijk na 8 - 24 uur. De i.v. injectie van *E.coli* stammen uit groep III veroorzaakt sterfte van de muizen binnen de 8 uur, behalve voor stam TO 10 waarbij de sterfte plaatsvindt tussen de 8 - 24 uur na de injectie. In kolom 4 van Tabel V-1 wordt de hemolysine productie van de *E.coli* stammen weergegeven. Van de a-virulente stammen produceert alleen TO 19 deze enzymen. Van de beide groep II stammen vertoont TO 8 geen en TO 30 wel productie. De virulente stammen uit groep II blijken in meerderheid wel hemolysines te produceren. Alleen stammen TO 10, 15 en 45 produceren deze enzymen niet. Het optreden van hemagglutinatatie met cavia en humane bloedgroep A erythrocyten is weergegeven in kolommen 5 en 6 van Tabel V-1. Op de stammen TO 37, 41 en 34 na vertonen alle stammen een mannose gevoelige agglutinatatie met cavia erythrocyten. Dit wijst op de aanwezigheid van type I pili. Tien van de twintig geteste stammen geven geen agglutinatatie met humane erythrocyten van bloedgroep A. Van de negen wel agglutineerbare stammen vertonen

Tabel V-1. Virulentie eigenschappen van de onderzochte E.coli stammen.

E.coli TO nr.	Virulentie groep ¹	Tijdstip van ²	Hemol. prod. ³	Hemagglutinatatie ⁴		Serotype ⁵
				Ca	Hu	
3	I	> 14 d	-	ms	-	O18 : K1
4	I	> 14 d	-	ms	-	O21 : K-
5	I	> 14 d	-	ms	ms	O77 : K-
6	I	> 14 d	-	ms	ms	O8 : K-
19	I	4-14 d	+++	ms	ms	O126 : K-
21	I	> 14 d	-	ms	ms	a.a.
37	I	> 14 d	-	-	-	O72 : K100
41	I	> 14 d	-	-	-	O75 : K100
42	I	> 14 d	-	ms	-	n.t. : K-
8	II	1-4 d	-	ms	-	O147 : K-
30	II	8-24 u	+++	ms	mR	O6 : K2
10	III	8-24 u	-	ms	-	O86 : K1
13	III	< 8 u	+	ms	-	O143 : K-
15	III	< 8 u	-	ms	-	O133 : K-
31	III	< 8 u	+++	ms	ms	O6 : K23
33	III	< 8 u	+++	ms	ms	O6 : K23
34	III	< 8 u	+++	-	mR	O18ac: K?
35	III	< 8 u	+++	ms	ms	O6 : K23
40	III	< 8 u	++	ms	-	O6 : K23
45	III	< 8 u	-	ms	ms	O7 : K1

¹ I = a-virulente stammen; II = niet pathogene stammen; III = virulente stammen.

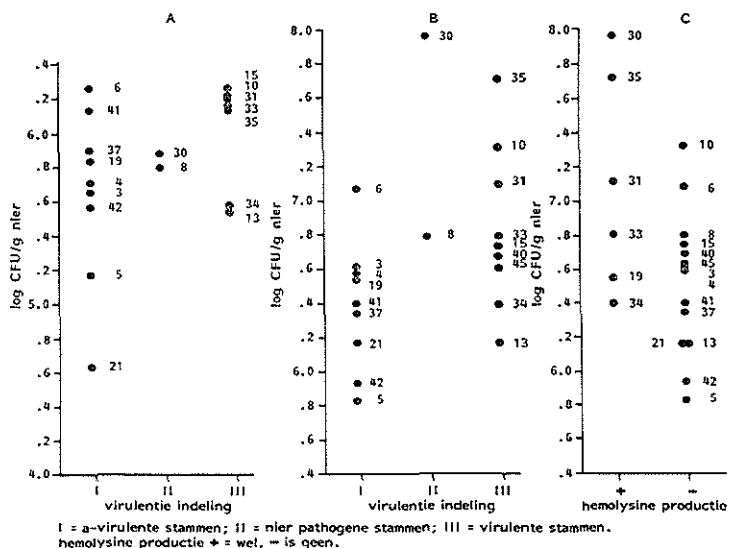
² d = dagen, u = uren.

³ de notatie der hemolysine productie is vermeld in materialen en methoden.

⁴ Ca = cavia erythrocyten; Hu = humane erythrocyten van bloedgroep A; ms = mannose gevoelig; mR = mannose resistent; - = geen hemagglutinatatie.

⁵ n.t. = niet typeerbaar; a.a. = autoagglutinabel; K? = niet typeerbaar K antigeen.

Figuur V-1. Het verband tussen de virulentie der *E.coli* stammen in de muis en de rat. Per *E.coli* stam is weergegeven het verband tussen de mediane (A) en maximale (B) waarde van het aantal CFU/g nier (rechter nier, 4 dagen na inoculatie, geen therapie) bij de rat en de virulentie klassering bepaald bij de muis. Tevens is weergegeven (C) het verband tussen de maximale waarde van het aantal CFU/g nier (rechter nier, 4 dagen na inoculatie, geen therapie) bij de rat en de hemolysine productie van de stam.



E.coli TO 30 en 34 een mannose resistente agglutinatie, wijzend op de aanwezigheid van pili, niet behorend tot type I. Tenslotte zijn in kolom 7 van Tabel V-1 de serotyperingen van de *E.coli* stammen vermeld. Hierbij valt op dat het serotype O6 : K23 meerdere keren voorkomt bij de groep III stammen. Dit is echter het gevolg van het opzettelijk toevoegen van virulente stammen aan de onderzochte *E.coli* stammen.

Eveneens is bekeken in hoeverre de virulentie factoren welke bij de muis werden bepaald ook een rol spelen bij het infectiemodel in de rat. Hiertoe werd bekeken of er een verband aanwezig is tussen het aantal CFU/g nier bij de ratten met 4 dagen infectie zonder therapie, in het vervolg aangeduid als de contrôle groep, en de hierboven vermelde factoren. Elk van deze contrôle groepen bestond uit tenminste 10 ratten. De mediaan van de logaritme van de waargenomen aantallen varieerde voor de onderzochte stammen tussen de waarden 5,17 en 6,26. Uit Figuur V-1 A valt op te maken dat er geen correlatie aanwezig is tussen deze mediane waarden, waargenomen bij de rat, en de virulentie groepsindeling, ge-

baseerd op het verloop van het bacteriegetal in de nier van de muis. De uiterste waarden van de log CFU/g nier van de controle groepen vertonen per stam een bereik dat uiteenloopt van circa 0,6 voor *E.coli* TO 41 tot circa 3,5 voor *E.coli* TO 35. Indien de maximale waarde van de uitkomsten van de log CFU/g nier bij de rat per stam wordt uitgezet tegen de virulentie groepsindeling, bepaald bij de muis, dan blijkt er wel een correlatie te bestaan tussen de infectiegraad bij de rat en de muis (Figuur V-1 B). De virulente stammen van groep III vertonen hogere waarden dan de a-virulente stammen van groep I. De toets van Wilcoxon geeft tussen beide verdelingen een significant verschil (éénzijdige toetsing: $0,01 < \alpha < 0,025$). In Figuur V-1 C werden de maximale waarden van de log CFU/g nier bij de rat verdeeld op basis van de hemolysine productie. Hieruit blijkt dat de stammen die hemolysines produceren hogere waarden vertonen dan de stammen die deze enzymen niet produceren. Ook in dit geval blijken beide verdelingen een significant verschil te vertonen (Toets van Wilcoxon, eenzijdig, $0,025 < \alpha < 0,05$). Er bleek geen relatie te zijn tussen log CFU/g nier en het hemagglutinatiëpatroon der stammen.

Om het verband tussen de virulentie bij de muis en bij de rat en de serotypering te bekijken is in Tabel V-2 per stam de virulentie-groep bepaald bij de muis, de maximaal waargenomen waarde van het aantal CFU/g nier bij de rat en het serotype weergegeven. Opvallend hierbij is dat de combinatie O6 : K23 in het serotype zowel bij de muis als bij de rat samenvalt met een hoge virulentie. Stammen die in het bezit zijn van K antigenen blijken zowel bij de muis als bij de rat hoog danwel laag virulent te kunnen zijn.

De uitkomsten van de MEC waarden van de *E.coli* stammen, die in het therapiemodel zijn bestudeerd, staan vermeld in Tabel V-3. De MEC waarden variëren tussen 0,015 en 3,47 µg/ml. Een aantal stammen vertonen dezelfde MEC waarde. Om na te gaan of er een rechtstreeks verband tussen de MEC waarden en de virulentie bestaat is in Figuur V-5 de MEC waarde per virulentie-groep grafisch uitgezet. Uit deze figuur valt op te maken dat er geen rechtstreeks verband tussen beide grootheden aanwezig is. De verwachting dat hoge MEC waarden in meerderheid bij de virulente stammen zouden voorkomen werd niet bewaarheid.

Tabel V-2. *Vergelijking tussen de virulentie der E.coli stammen in de muis en in de rat met de serotypering der stammen.*

<i>E.coli</i> TO nr.	Virulentie ¹ indeling	Maximum log CFU/g nier	Serotype ²
30	II	7,96	O6 : K2
35	III	7,72	O6 : K23
10	III	7,32	O86 : K1
31	III	7,11	O6 : K23
6	I	7,08	O8 : K-
33	III	6,81	O6 : K23
8	II	6,79	O147 : K-
15	III	6,74	O133 : K-
40	III	6,69	O6 : K23
45	III	6,62	O7 : K1
3	I	6,61	O18 : K1
4	I	6,58	O21 : K-
19	I	6,55	O126 : K-
34	III	6,40	O18ac: K?
41	I	6,39	O75 : K100
37	I	6,35	O72 : K100
13	III	6,18	O143 : K-
21	I	6,18	a.a.
42	I	5,94	n.t. : K-
5	I	5,83	O77 : K-

¹ I = a-virulente stammen; II = nier-pathogene stammen; III = virulente stammen.

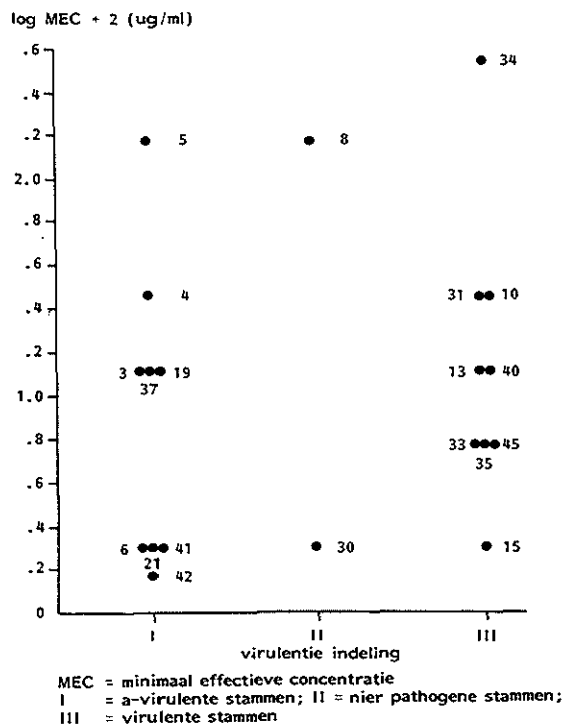
² n.t. = niet typeerbaar; a.a. = autoagglutininabel; K ? = niet typeerbaar K antigeen.

Tabel V-3. *De in vivo gevoeligheid (MEC) der onderzochte E.coli stammen.*

MEC ¹ (µg/ml)	<i>E.coli</i> TO nr.	MEC ¹ (µg/ml)	<i>E.coli</i> TO nr.
0,01	42	0,28	4, 10, 31
0,02	6, 15, 21, 30, 41	1,47	5, 8
0,06	33, 35, 45	3,47	34
0,13	3, 13, 19, 37, 40		

¹ MEC = minimaal effectieve concentratie.

Figuur V-2. Het verband tussen de in vivo gevoeligheid (MEC) en de virulentie der E.coli stammen.



Discussie.

De virulentie van een bacterie is te beschouwen als de resultante van een groot aantal factoren, welke ieder voor zich een wisselwerking vertonen met het afweermechanisme van de gastheer. Tot deze factoren behoren o.a. de samenstelling van de celwand, de aanwezigheid van pili en de productie van enzymen en toxines. De wisselwerking met de gastheer mechanismen komt naar voren uit het feit dat virulentie gastheer specifiek is ⁴². afhankelijk is van de weg waarlangs de bacteriën worden toegediend ⁴³ en van orgaan tot orgaan kan verschillen ⁴⁴.

De bepaling van de virulentie van de in dit onderzoek gebruikte stammen zou dan ook optimaal geweest zijn, als deze was uitgevoerd in de rat met speciale aandacht voor het gedrag van de bacteriën in de nier. Aangezien de rat slechts door het nemen van extreme maatregelen te infecteren is

met *E.coli* bacteriën, werd gebruik gemaakt van de uitkomsten van een ander model. Gekozen werd voor het muis-model dat ontwikkeld was door Van den Bosch e.a. ³⁹. In dit model wordt het verloop van de infectie in de nier als graadmeter voor de virulentie gebruikt. Aangenomen werd dat de verschillen in virulentie voor de muis en de rat relatief niet al te groot zijn. In principe is de bereikte infectiegraad van de controle groepen in het therapiemodel voor de rat eveneens een maat voor de virulentie. Doordat echter de mate waarin de nier door het aanprikken beschadigd werd per rat sterk kan verschillen, levert zelfs de mediane waarde van de log CFU/g nier uitkomsten een vertekend beeld voor de virulentie der stammen op.

Daarnaast moet men zich afvragen welke virulentie factoren in het toegepaste infectiemodel bij de rat een rol spelen. Infectie van de nier ontstaat hematogeen vanuit een primaire haard elders of als een opstijgende infectie vanuit de blaas. De overgang van het nierbekken naar medulla en cortex kan, neemt men aan, direct dan wel via een hematogene omweg plaatsvinden ⁴⁵. Aangezien de rat een dier is dat moeilijk te infecteren is, moet men zowel bij de hematogene route als bij de retrograde infectie traumatische hulpmiddelen aanwenden zoals massage van de nier ⁴⁶, het afbinden van een ureter ⁴⁷ of massage van een gevulde blaas ⁴⁸. Anderzijds kan men rechtstreeks de bacteriën in de nier injecteren zoals in het hier gebruikte therapiemodel is gedaan. Zowel in het therapiemodel als in de virulentietest van Van den Bosch e.a. wordt een belangrijk deel van de infectieweg afgesneden. Men kan zich voorstellen dat hierdoor een aantal virulentie factoren zoals de aanhechting aan epitheel cellen een ondergeschikte rol spelen.

De resultaten van het onderzoek bevestigen in meer of mindere mate de hierboven beschreven verwachting. De virulentie-indeling der stammen op basis van het muismodel bleek niet tot uiting te komen in de verdeling der mediane uitkomsten van de nier-infectie zonder therapie bij de rat. Beschouwt men echter de maximale waarde van de log CFU/g nier in plaats van de mediaan, dan bleek er een redelijke overeenkomst te bestaan tussen de virulentie in de muis en de rat. Men kan aannemen dat door deze benadering een selectie plaatsvindt van die ratten, welke bij het aanprikken van de nier een maximale beschadiging opliepen. Hiermee werd dus het toeval in de mate der beschadiging sterk beperkt, zodat het hierop volgende infectie-verloop de virulentie der verschillende

E.coli stammen weerspiegelt. Ook de invloed van de productie van hemolysines kwam alleen bij de maximale log CFU/g nier waarde tot uiting. Dat deze factor van invloed is werd verwacht, immers deze enzymen zijn ook in staat om weefsel-cellen te beschadigen. Hierdoor kan de infectie zich makkelijker handhaven c.q. uitbreiden. Er bleek geen verband te bestaan tussen de maximale log CFU/g nier en het hemagglutinatiëpatroon. De aanwezigheid van hemagglutinatatie geeft aanwijzingen over het voorkomen van pili ⁴¹. Deze spelen een rol bij de aanhechting van de bacteriën aan weefsel-cellen. Zoals eerder vermeld, werd niet verwacht dat de aanhechting een grote rol speelt in het therapiemodel. Het ontbreken van een verband tussen het hemagglutinatiëpatroon en de log CFU/g nier van de stammen bevestigde dit vermoeden. Uitspraken over correlaties tussen serotype en virulentie bij de muis en bij de rat zijn uit dit onderzoek moeilijk te verkrijgen. Enerzijds doordat een gering aantal stammen werd onderzocht. Anderzijds omdat met opzet virulente stammen met het serotype O6 : K23 aan de te onderzoeken populatie werden toegevoegd om een gelijk aantal virulente en a-virulente stammen te verkrijgen. Slechts kan worden gesteld dat de serotypen O6 : K1, 2 of 23 die bij de muis een hoge virulentie vertonen ook bij de rat zeer virulent zijn ⁴⁹.

Uit de afwezigheid van een direct verband tussen de MEC waarde en de virulentie der *E.coli* stammen mag niet geconcludeerd worden dat er geen correlatie tussen beide aanwezig is. Het is zeer goed mogelijk dat de invloed van de virulentie door andere factoren overschaduwd wordt. In Hoofdstuk VII zal hierop nader worden ingegaan bij de vergelijking van het in-vivo en in-vitro onderzoek.

VERGELIJKEND ONDERZOEK NAAR DE UITKOMSTEN VAN EEN AANTAL *IN VITRO* UITGEVOERDE KWANTITATIEVE GEVOELIGHEIDSBEPALINGEN BIJ *E.COLI*.

Inleiding.

Bij de antimicrobiële behandeling van ernstige infecties is het gewenst vroegtijdig te beschikken over het gevoeligheidspatroon van de verwekker voor een aantal antibiotica. Men gaat er daarbij vanuit dat wanneer de verwekker gevoelig is voor een antibioticum, de behandeling met dat middel zal slagen. Of dit inderdaad het geval is hangt behalve van de gevoeligheid van de verwekker ook af van een aantal andere factoren, zoals de toestand van de gastheer, met name de werking van de afweer, de lokalisatie van de infectie, de aard van de verwekker, de werking en de verdeling van het antibioticum dat wordt toegediend. Bij de bestudering van de in-vitro gevoeligheid van de verwekker voor een antibioticum wordt dus slechts één enkel facet uit een complex geheel genomen. Daarbij dient men zich ook te realiseren dat de groei van bacteriën in kunstmatige voedingsbodems op geheel andere wijze verloopt dan in een gastheer. Eudy en Burrous toonden aan dat de groeisnelheid *in vivo* veel langzamer is dan *in vitro* ⁵⁰. In de weefsels komen generatietijden van 20 tot 24 uur voor. In hoeverre in-vivo groei van bacteriën beïnvloed wordt door een beperking van de voeding en wat hiervan de gevolgen zijn voor de structuur en de gevoeligheid van de bacteriën, dient nader te worden onderzocht ⁵¹.

Ondanks de bezwaren welke men kan hebben tegen een voorspelling van de in-vivo gevoeligheid op basis van de in-vitro resultaten heeft een langdurige empirische ervaring geleerd dat de in-vitro gevoeligheid bruikbaar is als eerste indicatie voor het instellen van een antimicrobiële behandeling bij een infectieziekte.

De in dit hoofdstuk beschreven onderzoeken hebben tot doel na te gaan in hoeverre verschillende technieken ter bepaling van de in-vitro werking van het antibioticum dezelfde danwel elkaar aanvullende informatie

verschaffen. Daarnaast wordt bij enkele technieken onderzocht welke invloed een wijziging in de testcondities heeft op de bestudeerde parameters.

Voor het bepalen van de in-vitro gevoeligheid staan een aantal methoden ter beschikking. Deze vallen grofweg uiteen in twee groepen: methoden die een bepaald effect meten door middel van één aflezing na een bepaalde tijdsduur en methoden die het effect van het antibioticum op de bacteriën met behulp van een reeks metingen in de tijd vastleggen. Bij de eerste groep kan men nog onderscheid maken tussen kwantitatieve en kwalitatieve methoden. De kwantitatieve methoden geven aan bij welke concentratie een bepaald effect optreedt, terwijl de kwalitatieve methoden de bacteriën indelen in een aantal gevoeligheidsklassen zoals gevoelig, matig gevoelig en ongevoelig. In deze studie wordt enkel aandacht geschonken aan de kwantitatieve methoden.

De uitkomsten van een aantal kwantitatieve in-vitro gevoeligheidsbepalingen zullen met elkaar worden vergeleken, zoals de minimaal remmende concentratie (MRC), de minimale antibioticum concentratie (MAC), de concentraties die de kolonievorming op agar beïnvloeden en de afstervings-snelheid. Onder MRC verstaat men de laagste concentratie van het antibioticum die tot gevolg heeft dat de groei van de bacteriën volledig wordt geremd. De MAC geeft de laagste concentratie van het antibioticum aan die het aantal bacteriën na een bepaalde tijdsduur ten opzichte van de ongeremde groei met 1 log van het aantal heeft doen afnemen ⁵². De afstervings-snelheid is de snelheid waarmee de bacteriën onder invloed van een bepaalde antibioticum concentratie worden gedood.

Materialen en methoden.

Media en chemicaliën. Nutriënt Broth nr. 2 (NB); Diagnostic Sensitivity Test-agar (DST); Sensitest-agar (SA); Iso-sensitest-agar (ISA); Tryptone Soya-agar (TSA); Nutriënt-agar (NA) (alle Oxoid).

Brain Heart Infusion-agar (BHIA); Müller-Hinton-agar (MHA); Antibiotic medium nr. 1, 2, 4, 5 en 11 (AM 1 - AM 11) (alle Difco).

Ampicilline (Beecham).

Bacteriestammen. De *E.coli* stammen werden geïsoleerd bij patiënten van het Academisch Ziekenhuis Dijkzigt te Rotterdam of werden welwillend ter beschikking gesteld door Dr.J.F.van den Bosch van de V.U. te Amsterdam.

Bacterie tellmethoden. Voor het tellen van de bacteriën werd een tweetal methoden ter bepaling van het aantal CFU/ml toegepast. Bij de bepaling van de MAC en de concentraties die de kolonievorming op agar beïnvloeden werd 0,2 ml van een geschikte verdunning van de te tellen suspensie uitgespateld op DST-agar. Na bebroeding werden de kolonies geteld en werd het aantal CFU/ml in de oorspronkelijke suspensie berekend.

Bij de afstervingsexperimenten werd gebruik gemaakt van een Spiral Plate Maker (Spiral Systems Inc.). De telling werd uitgevoerd zoals in de handleiding beschreven voor het gebruik van petri-schalen met een doorsnede van 14 cm. De methode komt erop neer dat spiraalsgewijs een voedingsbodem wordt beënt met een continu afnemend volume van de bacterie suspensie. Na incubatie wordt op een bepaald, geschikt deel van de plaat het aantal kolonies geteld. Door dit aantal te delen door de volume fractie welke op het getelde agar-gedeelte is geënt verkrijgt men het aantal CFU/ml.

MRC bepaling. Voor deze bepaling werd gebruik gemaakt van een agar verdunningsmethode. Eerst werd van een overnacht cultuur van een *E.coli* stam, die zonder schudden werd bebroed in NB, een 10^3 maal verdunde bacterie suspensie in fysiologisch zout (FZ) gemaakt. Vervolgens werd met behulp van een Steers-replicator 0,003 ml suspensie op een ampicilline bevattende DST-agar plaat gebracht. Per entplaats werd op deze wijze circa 10^3 CFU aangebracht. Afhankelijk van het experiment bevatten de platen één van de volgende reeksen ampicilline concentraties.

0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 -- max. 50 µg/ml (I)

0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 -- max. 10 µg/ml (II)

Bij wijze van controle werd bij elk experiment een DST plaat zonder antibioticum meegenomen. Na incubatie bij 37°C gedurende 18 uur werden de platen afgelezen. Als criterium voor de MRC is aangehouden, die concentratie, die per entplaats niet meer dan 5 kolonies vertoonde. De MRC waarden verkregen via deze procedure werden bij de weergave van de resultaten voorzien van het bijvoegsel l.i. (laag inoculum). Bij enkele experimenten zijn de proefomstandigheden enigszins gewijzigd. Deze wijzigingen hadden betrekking op de samenstelling van de agar-voedingsbodem en op de pH waarde van de voedingsbodem.

Naast de bepaling van de MRC l.i. is ook een MRC bepaling met een hoog inoculum uitgevoerd (h.i.). De hierbij gevolgde procedure verschilt met de bovenvermelde alleen ten aanzien van de voorbereiding van

het inoculum. Voor de bepaling van de MRC h.i. werd uitgegaan van een onder schudden gegroeide overnacht cultuur van *E.coli* in NB. Deze cultuur werd door verdunning met NB met behulp van een Vitatron colorimeter bij 700 nm gesteld op een optische dichtheid (OD) van 0,5. Direct daarna werd de suspensie gebruikt voor beënting. Op deze wijze werd per spot circa 10^6 CFU aangebracht. Bij deze bepaling werd bovenstaande reeks II van ampicilline concentraties toegepast.

MAC bepaling. De gevolgde methode is een modificatie van de methode die werd beschreven door Lorian en De Freitas ⁵³. Uitgaande van een onder schudden gegroeide overnacht cultuur van een *E.coli* stam in NB werd door verdunning met NB een bacterie suspensie met OD van 0,1 verkregen. Vervolgens werd de gestelde suspensie 10^3 maal verdund met NB en daarna 2 uur geïncubeerd onder voortdurend schudden bij 37°C. Na deze voor-incubatie werd ampicilline toegevoegd en wel zodanig, dat in de gevormde subculturen concentraties met de volgende waarden werden verkregen: 0,1 - 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1,0 -- max. 10 µg/ml, alsmede een subcultuur zonder ampicilline. De subculturen werden vervolgens 4 uur geïncubeerd, waarna het aantal CFU/ml werd bepaald. Als MAC werd die concentratie aangemerkt die ten opzichte van de cultuur zonder ampicilline een daling in het aantal CFU/ml van tenminste de waarde 1 op de logaritmische schaal teweeg bracht. Aangezien de incubatie-periode afwijkt van de door Lorian en De Freitas voorgestelde periode, wordt de op deze wijze verkregen concentratie aangeduid als MAC 4uur.

Bepaling van de concentraties die de kolonievorming op agar beïnvloeden. Uitgaande van een onder schudden gegroeide overnacht cultuur van een *E.coli* stam in NB werd een verdunning van 10^3 maal in NB gemaakt. Deze cultuur werd geïncubeerd totdat een OD van 0,5 werd bereikt. Een dergelijke cultuur bevindt zich in de late log-fase en bevat circa 5×10^8 CFU/ml. Na 10^6 maal verdund te zijn met NB, werd 0,5 ml van deze verdunde suspensie uitgespreid over een DST-agar plaat zonder ampicilline en over een reeks platen met de volgende ampicilline concentraties 0,2 - 0,4 - 0,6 -- max. 10 µg/ml. Na incubatie bij 37°C gedurende 18 uur werd het aantal kolonies geteld. Door het percentage van de overlevende bacteriën ten opzichte van het aantal bacteriën op de plaat zonder ampicilline uit te zetten tegen de bijbehorende concentratie werd een dosis-responsie relatie verkregen.

Bepaling van de afstervingsnelheid. Uitgaande van een onder schudden

Tabel VI-1. Concentraties ampicilline aanwezig in de subculturen bij de afstervingsexperimenten. Weergegeven zijn de concentraties in $\mu\text{g/ml}$ en tussen haakjes de logaritmen hiervan. In afhankelijkheid van de waarde van de minimaal remmende concentratie bij laag inoculum (MRC l.i.) van de betrokken *E.coli* stam werd één der reeksen toegepast.

MRC l.i. tussen 0 en 2	MRC l.i. tussen 2 en 3	MRC l.i. groter dan 3
$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
0	0	0
0,5 (-0,3)	0,71 (-0,15)	2,00 (0,30)
0,71 (-0,15)	1,00 (0,00)	2,51 (0,40)
1,0 (0,00)	1,41 (0,15)	3,16 (0,50)
1,41 (0,15)	2,00 (0,30)	3,98 (0,60)
2,0 (0,30)	2,82 (0,45)	5,01 (0,70)
2,82 (0,45)	3,98 (0,60)	6,31 (0,80)
3,98 (0,60)	5,62 (0,75)	7,94 (0,90)
5,62 (0,75)	7,95 (0,90)	10,0 (1,00)
25,0	25,0	25,0

gegroeide overnacht cultuur van een *E.coli* stam in NB werd met behulp van NB de OD van de suspensie op 0,1 gesteld. Vervolgens werd de suspensie 2700 x verdund met NB en gedurende 2 uur voor-geïncubeerd bij 37°C. Daarna werd de cultuur verdeeld in een aantal subculturen waaraan met uitzondering van de contrôles ampicilline werd toegevoegd. In Tabel VI-1 staat het schema vermeld van de toegepaste ampicilline concentraties in afhankelijkheid van de gebruikte *E.coli* stam. De op deze wijze gevormde subculturen werden 2 uur geïncubeerd, waarbij iedere 20 minuten een bemonstering plaatsvond (start op $t = 0$, direct na toevoeging van ampicilline). In de monsters werd het aantal CFU/ml bepaald met behulp van het Spiral Plate Maker systeem. Om te vermijden dat de hoge ampicilline concentraties de telling zouden beïnvloeden, werd bij deze concentraties een penicillinase behandeling toegepast alvorens werd uitgeënt. Door voor iedere *E.coli* stam de logaritme van het aantal CFU/ml bij een bepaalde ampicilline concentratie uit te zetten tegen de tijd, werden zogenaamde afstervingscurven verkregen (zie Figuur VI-6 A). Deze curven vertoonden na een initiële afbuiging een lineair verloop in de tijd. Met behulp van een lineaire regressie analyse werd de zogenaamde ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante (k_a) bepaald. Tussen de

waarde van k_a en de ampicilline concentratie in het medium (C) bleek een verband te bestaan. Om praktische redenen werd het verschil tussen k_a en de groeiconstante bij ongeremde groei (k_o) uitgezet tegen de concentratie. Op deze wijze ontstond een puntenverzameling waarin een patroon te herkennen viel, dat wiskundig kon worden beschreven met de formule:

$$k_o - k_a = (k_o - k_a)_{\max} \{1 - \exp - \alpha (C - C_o)\} \text{ voor } C \geq C_o$$

waarin α = een constante, welke de steilheid van het functieverloop bepaalt; $k_a \max$ = maximaal bereikbare waarde van k_a ; C_o = de minimale concentratie ampicilline nodig om een effect van ampicilline op de groei te bewerkstelligen.

Met behulp van een computerprogramma (Curfit) werd de puntenverzameling ingepast op de functie. Bij dit programma werden de punten gewogen (statistische weegfunctie: $1/Y_i$) ingepast op de functie door te zoeken naar de kleinste kwadraten afwijking.

Voor iedere *E. coli* stam werd op deze wijze het karakteristieke patroon van $k_o - k_a$ versus de ampicilline concentratie vastgelegd door de parameters: k_o , $k_a \max$, α en C_o .

Resultaten.

MRC bepalingen.

Met negen *E. coli* stammen werd in eerste instantie de invloed van de groeifase en de dichtheid van het inoculum, alsmede van de samenstelling en de pH van de voedingsbodems op de MRC waarde onderzocht. Ook werd gekeken naar de spreiding van de MRC waarden, wanneer deze bij herhaling werden bepaald. Een inoculum bestaande uit bacteriën uit de log-fase dan wel uit de stationaire fase, bleek niet van invloed op de MRC waarde te zijn. De dichtheid van het inoculum bleek wel van invloed te zijn. Het onderzoek betreffende deze invloed is daarom bij een groter aantal stammen bekeken. Op de resultaten hiervan wordt in het vervolg ingegaan. Toepassing van verschillende voedingsbodems gaf verschillen in de MRC waarden te zien. In vergelijking tot DST konden de media in 3 groepen worden ingedeeld:

I Gelijke MRC waarden: TSA, NA en MHA.

II Hogere MRC waarden: SA, ISA, BHIA, AM 5 en AM 11.

III Lagere MRC waarden: AM 1, 2 en 4.

Nadere beschouwing van de media leerde, dat de pH per groep verschillen vertoonde. De pH van de groepen I, II en III bedroegen respectievelijk

Tabel VI-2. De invloed van de pH van het medium op de minimaal remmende concentratie (MRC).

medium ¹	pH	<i>E. coli</i>	MRC (µg/ml)								
			TO 1	TO 2	TO 3	TO 4	TO 5	TO 6	TO 7	TO 8	TO 9
AM 1	6,6		1,6	0,2	0,8	3,1	1,6	1,6	1,6	3,1	0,4
AM 1	7,4		3,1	0,8	3,1	12,5	6,25	6,25	3,1	6,25	0,8
DST	6,0		1,6	0,8	0,8	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	0,8
DST	7,4		1,6	1,6	1,6	6,25	6,25	6,25	3,1	12,5	1,6
DST	8,0		3,1	1,6	3,1	12,5	6,25	6,25	6,25	12,5	3,1

¹ AM 1 = antibiotic medium nr. 1; DST = diagnostic sensitivity test agar.

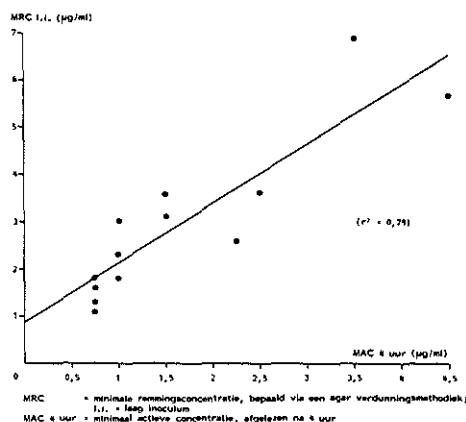
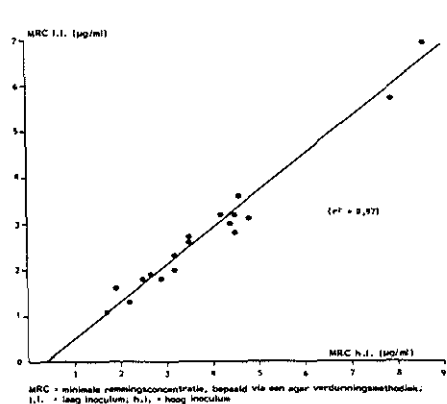
Tabel VI-3. Frequentieverdeling van de minimaal remmende concentratie (MRC) bij 5 bepalingen welke op afzonderlijke dagen werden uitgevoerd.

MRC (µg/ml)	<i>E. coli</i>	waargenomen frequentie								
		TO 1	TO 2	TO 3	TO 4	TO 5	TO 6	TO 7	TO 8	TO 9
0,8		-	3	-	-	-	-	-	-	-
1,6		2	2	4	-	-	-	3	-	3
3,1		3	-	1	4	4	5	2	1	2
6,25		-	-	-	1	1	-	-	4	-
12,5		-	-	-	-	-	-	-	-	-

7, 7,4 en 6,6. De invloed van de pH wordt in Tabel VI-2 getoond voor een tweetal media. Het blijkt dat verlaging der pH leidt tot een lagere MRC waarde op dezelfde voedingsbodem. Het vooronderzoek naar de spreiding tussen MRC resultaten van bepalingen op verschillende dagen uitgevoerd, toont aan (Tabel VI-3) dat de waarden slechts een geringe spreiding te zien geven. Gezien dit resultaat werd besloten in het vervolgonderzoek de stappen in de ampicilline reeks te verkleinen (reeks II). Bij toepassing van deze reeks bleek deze wijziging aanvaardbaar. De variatie coëfficiënt voor deze methodiek bedroeg bij 5 afzonderlijke bepalingen 10,4% (SD = 3,6%).

In het vervolgonderzoek naar de invloed van het aantal bacteriën in

Figuur VI-1 (links). De invloed van het inoculum op de waarde van de minimaal remmende concentratie (MRC). Weergegeven is het verband tussen de MRC bij laag inoculum (l.i.) en bij hoog inoculum (h.i.). Lineaire regressie: $MRC\ l.i. = -0,25 + 0,78 \times MRC\ h.i.$



Figuur VI-2 (rechts). Vergelijking tussen de minimaal remmende concentratie bij laag inoculum (MRC l.i.) en de minimale antibioticum concentratie (MAC 4uur). Lineaire regressie: $MRC\ l.i. = 0,82 + 1,28 \times MAC\ 4uur.$

het inoculum werden van 20 stammen de MRC l.i. en MRC h.i. bepaald. De resultaten hiervan zijn opgenomen in het overzicht van de in-vitro gevoeligheidsparameters (Tabel VI-4, kolom 2 en 3). De MRC l.i. is de gemiddelde waarde van 5, de MRC h.i. het gemiddelde van 3 waarnemingen. De gemiddelde ratio tussen de MRC h.i. en de MRC l.i. is 1,42 (SD = 0,14; uiterste waarden 1,19 en 1,69). In Figuur VI-1 is het verband tussen beide MRC waarden grafisch weergegeven. Via lineaire regressie werd de volgende vergelijking verkregen:

$$MRC\ l.i. = -0,25 + 0,78 \times MRC\ h.i. \quad (r^2 = 0,97).$$

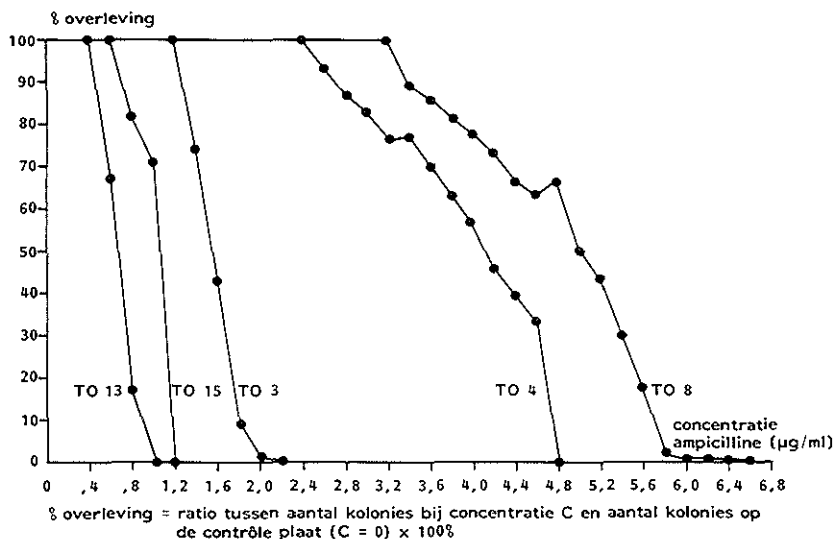
MAC 4uur bepalingen. De resultaten van de MAC 4uur bepalingen van 13 stammen zijn weergegeven in het overzicht van de in-vitro gevoeligheidsparameters (Tabel VI-4, kolom 4). Aangezien de reductie in het aantal overlevende bacteriën voor de MAC 4uur bepaling veel kleiner (90%) is dan de reductie bij de MRC bepaling (circa 97%), was te verwachten dat de MAC 4uur waarden onder de MRC waarden zouden liggen. De resultaten

bevestigen deze verwachting, de gemiddelde ratio tussen MRC l.i. en MAC 4uur bedraagt 1,9 (SD = 0,5). Figuur VI-2 toont het verband tussen beide grootheden. Lineaire regressie levert het volgende matige verband: $MRC\ l.i. = 0,82 + 1,28 \times MAC\ 4uur$ ($r^2 = 0,79$).

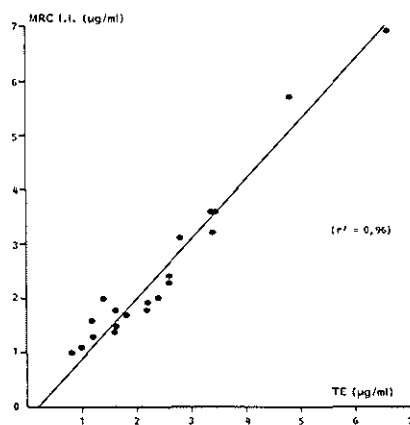
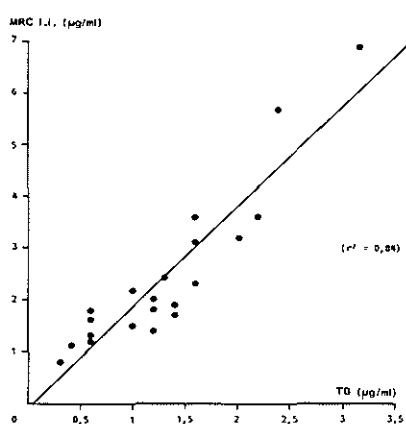
Tabel VI-4. *Overzicht van de parameters voor de in vitro gevoeligheid van E.coli voor ampicilline. Weergegeven zijn de minimaal remmende concentratie bij laag en hoog inoculum (MRC l.i. resp. h.i.), de minimale antibioticum concentratie (MAC 4uur), de maximale concentratie waarbij de kolonievorming op agar niet wordt beïnvloed (TB), de minimale concentratie waarbij geen kolonievorming op agar meer plaatsvindt (TE), de minimale concentratie, waarbij ampicilline de groei in vloeibaar medium niet beïnvloedt (Co). D.m.v. x is aangegeven dat de bepaling voor de desbetreffende E.coli stam niet is uitgevoerd.*

<i>E.coli</i> TO nr.	MRC l.i. (µg/ml)	MRC h.i. (µg/ml)	MAC 4uur (µg/ml)	TB (µg/ml)	TE (µg/ml)	Co (µg/ml)
1	2,2	x	x	1,0	2,2	x
2	0,8	x	x	0,3	1,0	x
3	1,8	2,9	1,0	1,2	2,2	0,7
4	5,7	7,9	4,5	2,4	4,8	2,3
5	3,6	4,6	2,5	2,2	3,4	1,2
6	3,6	4,9	1,5	1,6	3,4	1,3
7	2,4	x	x	1,3	2,6	x
8	6,9	8,6	3,5	3,2	6,6	3,6
9	1,2	x	x	0,6	1,4	x
10	1,3	2,2	0,75	0,6	1,2	0,6
11	1,7	x	x	1,4	1,8	x
12	1,5	x	x	1,0	1,6	x
13	1,1	1,7	0,75	0,4	1,0	0,5
14	2,3	x	x	1,6	2,6	x
15	1,6	1,9	0,75	0,6	1,2	0,6
16	3,2	x	x	2,0	3,4	x
17	1,9	x	x	1,4	2,2	x
18	1,4	x	x	1,2	1,6	x
19	1,8	2,5	0,75	0,6	1,6	0,3
20	2,0	x	x	1,2	2,4	x
21	3,1	4,8	1,5	1,6	2,8	1,2
30	2,6	3,5	2,25	x	x	1,2
31	2,3	3,2	1,0	x	x	0,9
33	3,2	4,2	x	x	x	0,7
34	3,2	4,4	x	x	x	1,0
35	2,7	3,5	x	x	x	1,1
37	3,0	4,4	1,0	x	x	0,9
40	1,9	2,7	x	x	x	0,9
41	2,8	4,5	x	x	x	1,2
42	3,2	4,5	x	x	x	1,2
45	2,0	2,9	x	x	x	0,4

Figuur VI-3. Het verband tussen het vermogen tot kolonievorming op agar, weergegeven als overlevingspercentage en de concentratie ampicilline voor E.coli TO 3, 4, 8, 13 en 15.



Figuur VI-4 (links). Vergelijking tussen de minimaal remmende concentratie bij laag inoculum (MRC l.i.) en de maximale concentratie waarbij de kolonievorming op agar niet beïnvloed wordt door ampicilline (TB). Lineaire regressie: $MRC\ l.i. = -0,20 + 1,99 \times TB$.



Figuur VI-5 (rechts). Vergelijking tussen de minimaal remmende concentratie bij laag inoculum (MRC l.i.) en de minimale concentratie waarbij de kolonievorming op agar meer plaatsvindt (TE). Lineaire regressie: $MRC\ l.i. = -0,24 + 1,10 \times TE$.

Bepaling van de concentraties die de kolonievorming op agar beïnvloeden.

Van een twintigtal der bestudeerde stammen werd het verband tussen het vermogen tot vorming van kolonies en de concentratie ampicilline in het medium bepaald. Figuur VI-3 toont enkele voorbeelden van deze verbanden. Uitgezet is het percentage overleving, als maat voor het aantal gevormde kolonies tegen de concentratie ampicilline. Het verloop van het overlevingspercentage laat zien dat er een minimale concentratie ampicilline aanwezig moet zijn alvorens er sprake is van een vermindering van het aantal CFU. Bij concentraties boven deze minimale waarde ziet men het overlevingspercentage in wisselende mate afnemen. Om een eventueel verband tussen deze methodiek en de andere testsystemen te onderzoeken, zijn, uitgaande van deze curven, 2 parameters bepaald: concentratie TB = de hoogste concentratie die nog 100% overleving geeft en concentratie TE = de laagste concentratie waarbij geen kolonies worden gevormd.

In het overzicht van de in-vitro gevoeligheidsparameters zijn de waarden van TB en TE opgenomen (Tabel VI-4, kolommen 5 en 6). Voor iedere *E.coli* stam blijkt er een concentratie traject te bestaan waarin het vermogen tot vorming van kolonies afneemt. De verschillen tussen TB en TE variëren van 0,4 voor TO 11 en TO 18 tot 3,4 voor TO 8. Het blijkt dat het verschil tussen beide grootheden toeneemt met toenemende waarde van TE. Vergelijking van deze grensconcentraties met de MRC l.i. en de MAC 4uur geeft het volgende beeld te zien.

De waarde van TB blijkt voor iedere stam lager dan de MRC l.i. te zijn, terwijl de MAC 4uur waarde ongeveer gelijk is aan de TB waarde, met een uitzondering voor *E.coli* TO 4 (MAC 4uur = 4,5, TB = 2,4). Figuur VI-4 laat het verband tussen MRC l.i. en TB zien, terwijl lineaire regressie de vergelijking $MRC\ l.i. = -0,20 + 1,99 \times TB$ oplevert. Gezien de waarde van $r^2 = 0,84$, kan gesproken worden van een redelijk verband tussen beide grootheden. Berekening van de lineaire regressie tussen TB en MAC 4uur waarden leert dat: $TB = 0,34 + 0,63 \times MAC\ 4uur$. Het verband is echter matig, gezien de r^2 van slechts 0.79.

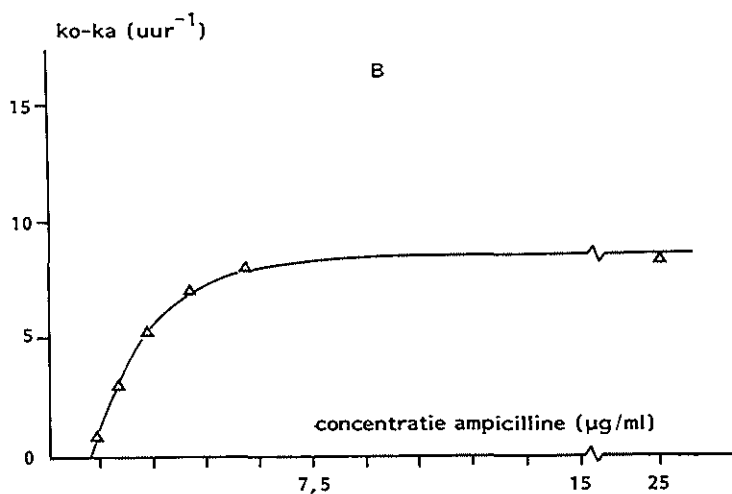
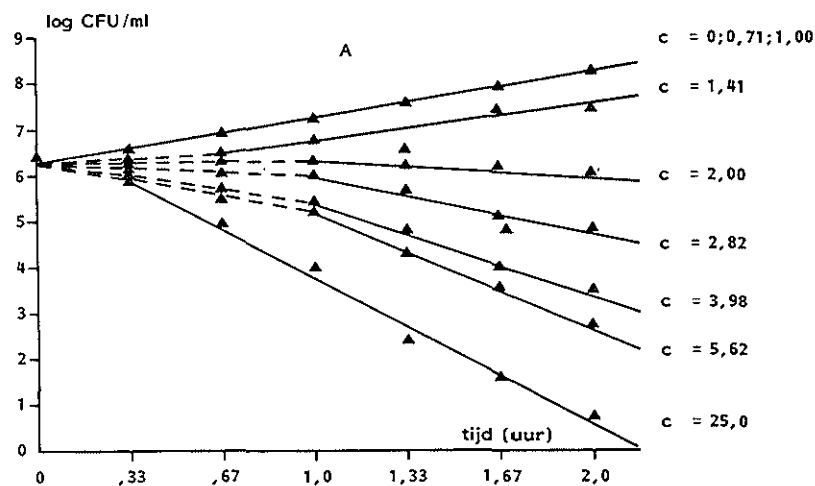
De waarde van TE vertoont voor de meeste stammen goede overeenkomst met de MRC l.i. Figuur VI-5 laat de correlatie tussen MRC l.i. en TE zien. Lineaire regressie geeft het volgende verband: $MRC\ l.i. = -0,24 + 1,10 \times TE$ met een zeer goede r^2 van 0,96. Het verband tussen MAC 4uur en TE blijkt matig te zijn. Lineaire regressie leert dat $TE = 0,71 + 1,20 \times MAC\ 4uur$ met een r^2 van slechts 0,78.

Bepaling van de afstervingsnelheid.

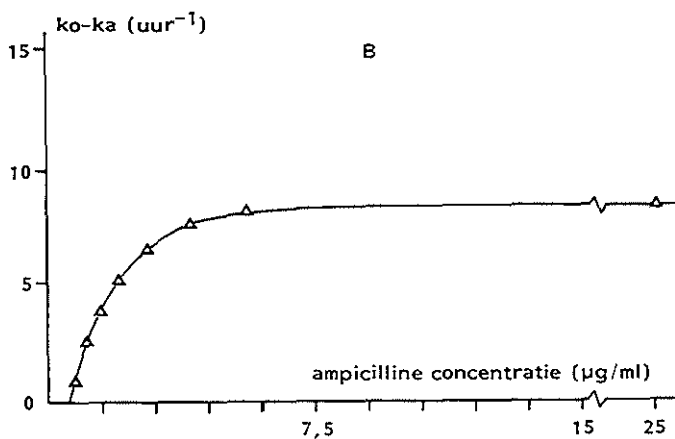
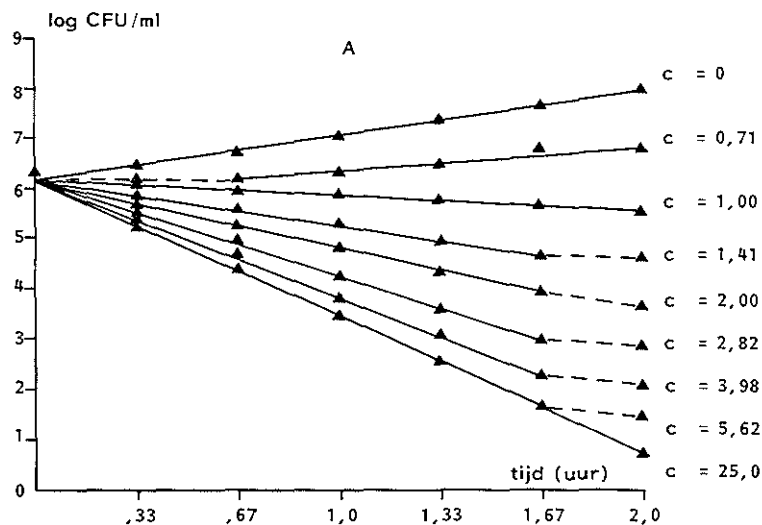
Bij deze bepalingen, die uitgevoerd werden met 20 van de bestudeerde *E.coli* stammen, werd onderzocht of het mogelijk is naast statische gegevens betreffende grensconcentraties, informatie te verkrijgen over de snelheid waarmee de bacteriën reageren op de werking van het antibioticum. Hiertoe werd het verloop van het aantal CFU/ml bij verschillende ampicilline concentraties in de tijd gevolgd. Afhankelijk van de MRC l.i. van de onderzochte stam werd een reeks ampicilline concentraties toegepast, die logaritmisch toeneemt van minimaal 0,5 µg/ml tot maximaal 10,0 µg/ml ampicilline (zie Tabel VI-1). Daarnaast werd, om de maximale afstervingsnelheid te bepalen bij iedere stam de concentratie 25 µg/ml meegenomen. De groeiremming respectievelijk afsterving werd voor iedere stam vergeleken met de ongeremde groei. Ter illustratie zijn in Figuur VI-6 A en VI-7 A de afstervingscurven van respectievelijk *E.coli* TO 30 en TO 10 weergegeven. Na een latente periode van maximaal 1 uur, waarin de bacteriën zich aanpassen aan de nieuwe toestand, vindt groei of sterfte plaats met een logaritmisch verloop in de tijd.

Met behulp van de uit de waargenomen afstervingscurven van een stam te berekenen groei- of ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante (k_o en k_a) werd voor iedere ampicilline concentratie de waarde k_o-k_a berekend. In Figuren VI 6 B en VI-7 B zijn de k_o-k_a waarden van *E.coli* TO 30 en TO 10 uitgezet tegen de bijbehorende concentraties ampicilline. Tevens is in deze figuren de door de computer berekende bijbehorende curve volgens de formule $k_o-k_a = (k_o-k_a)_{\max} \{1 - \exp - \alpha (C-C_o)\}$ voor $C \geq C_o$ weergegeven. Beide figuren tonen aan dat de waarnemingspunten zeer goed samenvallen met de voorgestelde curve. In Tabel VI-5 worden de waarden van de parameters $(k_o-k_a)_{\max}$, α en C_o van de onderzochte stammen weergegeven. Voor de volledigheid is in deze tabel ook de waarde van de (ongeremde) groeiconstante k_o weergegeven. Tenslotte is in kolom 6 van deze tabel de berekende concentratie C^* weergegeven. Deze concentratie werd uit de curve berekend voor het punt $k_a = 0$, en kan beschouwd worden als de MRC voortkomend uit dit testsysteem. Immers, de MRC is de minimale concentratie, waarbij de groei is geremd, dat wil zeggen $k_a = 0$. Vergelijking van deze C^* waarde met de MRC l.i. leert ons, dat de C^* concentratie lager uitvalt dan de MRC l.i. De gemiddelde ratio MRC l.i. / C^* bedraagt 1,9 (SD = 0,4).

Figuur VI-6. Resultaten afstervingsexperiment met E.coli TO 30. Weergegeven zijn (A) de afstervingscurven onder invloed van verschillende concentraties ampicilline (C) en (B) het verloop van de $ko-ka$ waarden met de ampicilline concentratie. De getrokken lijn in B is het berekende verloop gebaseerd op de formule:
 $ko-ka = (ko-ka)_{\max} \{1 - \exp - \alpha (C-Co)\}$ voor $C \geq Co$.



Figuur VI-7. Resultaten afstervingsexperiment met *E.coli* T0 10. Weergegeven zijn (A) de afstervingscurven onder invloed van verschillende concentraties ampicilline (C) en (B) het verloop van de ko-ka waarden met de ampicilline concentratie. De getrokken lijn in B is het berekende verloop, gebaseerd op de formule:
 $ko-ka = (ko-ka)_{\max} \{1 - \exp - \alpha (C-Co)\}$ voor $C \geq Co$.

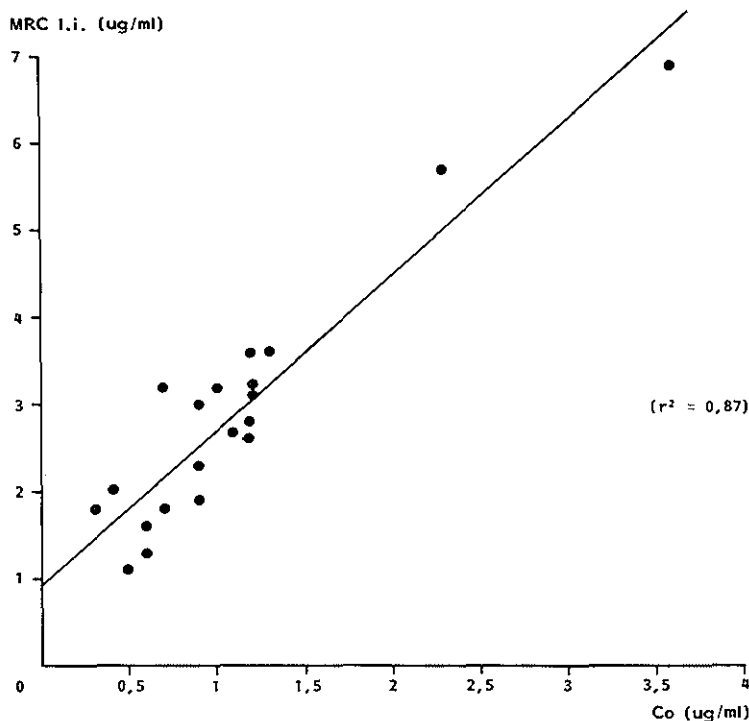


Tabel VI-5. Overzicht van de parameters bepaald in de afstervingsexperimenten in vloeibaar medium. Per E.coli stam zijn weergegeven de groeisnelheidsconstante bij ongeremde groei (k_0), het verschil tussen k_0 en de maximale ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante $(k_0 - k_a)_{\max}$, de parameter α , die in belangrijke mate het verloop van $(k_0 - k_a)$ met de ampicilline concentratie bepaalt, de maximale concentratie waarbij het ampicilline de groei niet beïnvloedt (C_0) en de berekende concentratie waarvoor geldt $k_a = 0$ (C^*).

E.coli TO nr.	k_0 uur ⁻¹	$(k_0 - k_a)_{\max}$ uur ⁻¹	α ml/ μ g	C_0 μ g/ml	C^* μ g/ml
3	2,0	8,6	0,7	0,7	1,0
4	2,2	7,6	0,3	2,3	3,4
5	2,6	10,7	0,5	1,2	1,7
6	2,1	7,2	0,5	1,3	2,0
8	2,1	7,5	0,6	3,6	4,2
10	1,9	8,1	0,8	0,6	0,9
13	2,4	10,0	1,6	0,5	0,7
15	2,3	7,8	2,3	0,6	0,8
19	2,1	6,9	1,2	0,3	0,6
21	1,8	6,2	0,4	1,2	2,0
30	2,4	8,6	0,6	1,2	1,8
31	2,3	9,0	1,2	0,9	1,2
33	2,2	8,7	0,5	0,7	1,3
34	1,3	9,1	0,4	1,0	1,3
35	1,8	8,0	0,4	1,1	1,7
37	2,2	10,9	0,4	0,9	1,5
40	2,3	9,6	2,0	0,9	1,0
41	2,2	8,8	1,1	1,2	1,6
42	2,4	10,5	0,6	1,2	1,6
45	2,4	10,5	0,7	0,4	0,8

Vergelijking van de grensconcentratie C_0 met enkele grensconcentraties uit de statische testsystemen leert ons het volgende. Zoals te verwachten heeft de C_0 voor iedere stam de laagste waarde in vergelijking met de andere parameters. C_0 is immers de laagste ampicilline concentratie waarbij een effect op de groei optreedt. Berekening van de lineaire regressie tussen de grootheden MRC l.i. respectievelijk

Figuur VI-8. Vergelijking tussen de minimaal remmende concentratie bij laag inoculum (MRC l.i.) en de maximale concentratie, waarbij in vloeibaar medium ampicilline de groei niet beïnvloedt (Co).
Lineaire regressie: $MRC\ l.i. = 0,93 + 1,78 \times Co$.



MAC 4uur, TB en Co levert de volgende verbanden:

$$MRC\ l.i. = 0,93 + 1,78 \times Co \quad (r^2 = 0,87)$$

$$TB = 0,39 + 0,86 \times Co \quad (r^2 = 0,86)$$

$$MAC\ 4uur = 0,32 + 1,15 \times Co \quad (r^2 = 0,72)$$

Er blijkt dus een redelijke correlatie te bestaan tussen MRC l.i. respectievelijk TB en Co ($r^2 = 0,87$ respectievelijk $0,86$), terwijl het verband tussen MAC 4uur en Co matig te noemen is ($r^2 = 0,72$). In Figuur VI-8 is een grafische weergave gegeven van de correlatie tussen MRC l.i. en Co, waaruit blijkt dat er voor de meeste stammen een redelijke correlatie tussen beide grootheden aanwezig is.

Ook werd in dit systeem voor een tweetal stammen onderzocht welke invloed de incubatie temperatuur heeft op het afstervingsproces c.q. de werking van het antibioticum. Tabel VI-6 toont de veranderingen die werden waargenomen in de parameters ten gevolge van deze temperatuurs-

Tabel VI-6. Invloed van de incubatie temperatuur op de groei- en afstervingsparameters k_0 , $(k_0 - k_a)_{\max}$, α en C_0 van E.coli.

E.coli TO nr.	Incubatie temp. °C	k_0^1 uur ⁻¹	$(k_0 - k_a)_{\max}^2$ uur ⁻¹	α^3 ml/ μ g	C_0^4 μ g/ml
13	37	2,4	10,0	1,6	0,5
	30	1,7	7,7	0,6	0,6
	22	0,8	4,7	0,4	1,2
41	37	2,2	8,8	1,1	1,2
	30	1,7	5,1	1,0	1,8
	22	1,0	5,5	0,4	2,2

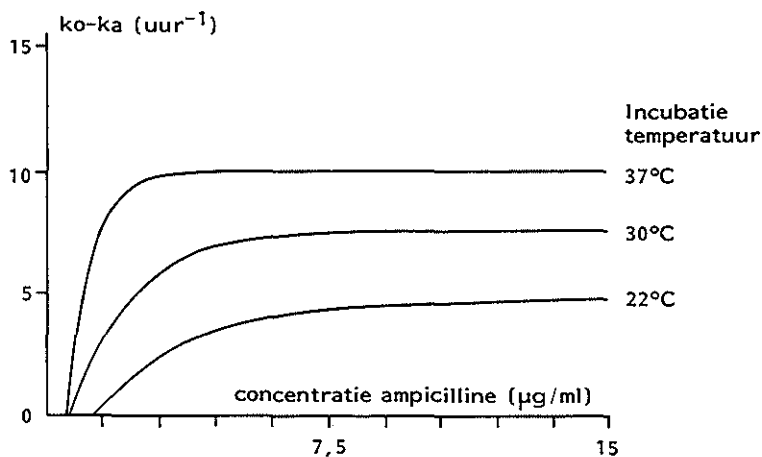
¹ k_0 = groeisnelheidsconstante bij ongeremde groei.

² $(k_0 - k_a)_{\max}$ = verschil k_0 en k_a max; k_a max = maximale waarde van de ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante (k_a).

³ α = een factor, bepalend voor de richtingscoëfficiënt van de curve.

⁴ C_0 = maximale concentratie, waarbij de groei van de bacteriën niet wordt beïnvloed.

Figuur VI-9. De invloed van de incubatie temperatuur op de afsterving van E.coli bacteriën onder invloed van ampicilline. Wijzigingen in het verloop van $k_0 - k_a$ met de concentratie voor E.coli stam TO 13 bij gewijzigde incubatie temperatuur.



$k_0 - k_a$ = verschil tussen de groeisnelheidsconstante (k_0) en de ogenschijnlijke groei- of afstervingsnelheidsconstante. (k_a)

Tabel VI-7. De uitkomsten van de Spearman rang correlatietest op de verschillende grensconcentraties. Weergegeven zijn het aantal geteste stammen (n), de correlatiecoëfficiënt (Rs) en de excentriciteit in een normale verdeling (z).

correlatie	n	Rs	z
MRC l.i. - MRC h.i.	20	0,95	4,16
MRC l.i. - MAC 4uur	13	0,92	3,19
MRC l.i. - TB	21	0,90	4,03
MRC l.i. - TE	21	0,98	4,36
MRC l.i. - Co	20	0,83	3,61
MRC h.i. - MAC 4uur	13	0,89	3,07
MRC h.i. - TB	10	0,95	2,85
MRC h.i. - TE	10	0,97	2,91
MRC h.i. - Co	20	0,90	3,91
MAC 4uur - TB	10	0,93	2,80
MAC 4uur - TE	10	0,95	2,85
MAC 4uur - Co	13	0,95	3,28
TB - TE	21	0,95	4,24
TB - Co	10	0,94	2,82
TE - Co	10	0,92	2,75

wijziging voor de stammen TO 13 en TO 41. Te zien valt dat een daling in de incubatie temperatuur zowel ko, (ko-ka) max als α doet afnemen, terwijl Co toeneemt. Figuur VI-9 laat het effect van deze temperatuur-daling zien op het verloop van de curven ko-ka versus de ampicilline concentraties voor *E.coli* TO 13.

Het verspreid over de onderzoeksperiode uitvoeren van de verschillende bepalingen heeft tot gevolg gehad dat niet voor elke *E.coli* stam alle gevoeligheidsbepalingen zijn uitgevoerd. Het is niet aannemelijk dat dit aanleiding heeft gegeven tot invoering van ontoelaatbare selecties. Wel bemoeilijkt dit gegeven de onderlinge vergelijkbaarheid van de verschillende grensconcentraties. Immers, de statistische significantie van de correlaties is zowel van n als r^2 afhankelijk. Eveneens is het mogelijk dat bepaalde verbanden niet lineair zijn. Om toch een uitspraak te kunnen doen over de onderlinge vergelijkbaarheid der grensconcentraties is onderzocht in hoeverre de relatieve uitkomsten van de verschillende bepalingen correleren. Hiertoe zijn de rang correlatiecoëfficiënten volgens Spearman voor de verschillende bepalingen onderling berekend. De waarden van deze coëfficiënten (Rs) en van de excentriciteit in de normale verdeling (z) zijn weergegeven in Tabel VI-7. Op basis van de waarden voor Rs en z kan worden gesteld dat de verschillende correlaties statistisch significant zijn.

Discussie.

De groep van β -lactam antibiotica, waartoe ampicilline behoort, zijn bactericide werkende middelen. Per definitie houdt dit in dat deze antibiotica bij een concentratie gelijk of groter dan de MRC de bacteriën doden. Zoals ook uit dit onderzoek is gebleken betekent dit geenszins dat zij slechts dodend kunnen werken. Bij concentraties, welke lager liggen dan de MRC treden veelal bacteriostatische effecten op ⁵⁴. De invloed van een antibioticum op de bacteriën kan tot uiting komen in een verandering van de structuur en morfologie van de cellen ⁵⁵, in een remming van de groei ⁵⁶ en in sterfte van de bacterie. Voor een goed inzicht in de werking van een antibioticum is het niet alleen van belang in welke mate bovengenoemde effecten optreden, maar is ook de snelheid waarmee de effecten tot uiting komen belangrijk. Door Rolinson e.a. is aangetoond dat de snelheid waarmee de bacteriën lyseren bij concentraties boven de MRC in belangrijke mate bepaald wordt door de concentratie van het antibioticum waaraan zij zijn blootgesteld ⁵⁷.

De bestudering van groei of sterfte onder invloed van antibiotica wordt om praktische redenen uitgevoerd in vloeibare media. Een complicatie bij dit onderzoek wordt gevormd door het na relatief korte tijd overschaduwde worden van het remmings- en/of afstervingsproces bij relatief lage concentraties door groei van aangepaste ofwel uitgeselecteerde resistente bacteriën. In Figuur VI-7 A is dit verschijnsel reeds na 2 uur waar te nemen. Het is echter niet duidelijk of dit fenomeen *in vivo* ook voorkomt en welke betekenis het dan heeft voor de therapie. Op vaste voedingsbodems is het fenomeen uiteraard niet waarneembaar. Wanneer dan het inoculum een resistente mutant bevat, kunnen nakomelingen van deze bacteriecel uitgroeien tot één kolonie. De verschillen, welke in het vooronderzoek gevonden werden bij de MRC bepaling op verschillende zogenaamde rijke, niet-synthetische voedingsbodems, kunnen verklaard worden uit de verschillen in de pH van deze bodems. Bekend is dat ampicilline optimaal functioneert bij een pH van 5,5 ⁵⁸. Verandering der pH van de media bleek inderdaad het op basis hiervan te verwachten effect op de MRC te vertonen. Bij gelijke pH der media werden geen verschillen in de MRC aangetoond. Wel is gebleken dat de dichtheid van het inoculum bij de agar-dilutie methodiek de waarde van de MRC beïnvloedt. De waarneming van Sherris, dat verhoging van het aantal CFU per entplaats leidt tot hogere MRC waarden, werd bevestigd ⁵⁹. Opvallend hierbij was de waar-

neming dat de ratio tussen de MRC l.i. en h.i. van de verschillende *E.coli* stammen slechts een geringe verspreiding vertoonde. Het onderzoek naar de dosis-response relatie op de plaat toont aan, dat het vermogen tot kolonievorming in aanwezigheid van ampicilline per bacterie uit de populatie verschilt. Dit verschil komt tot uiting in het concentratieverschil tussen TB en TE. Opvallend hierbij is dat het verschil tussen TB en TE groter wordt met toenemende waarde van TE. Een duidelijke verklaring hiervoor is niet te geven, wellicht houdt het verband met de vorming van resistentie die bij de penicillines stapsgewijs tot stand komt ⁵⁸.

Eveneens kwam uit deze experimenten naar voren, dat het verlies van het vermogen tot vorming van kolonies eerst na het bereiken van een bepaalde concentratie (TB) manifest wordt. Het bleek, dat er een redelijk lineair verband bestaat tussen de MRC l.i. en TB: $r^2 = 0,84$. Het is niet verwonderlijk dat er een goede correlatie met een r^2 van 0,96 tussen TE en MRC l.i. bestaat. Immers, ook de MRC wordt bepaald door de remming van de meest resistente bacteriën uit de populatie. Vergelijking van de waarde TB met de minimale grensconcentratie uit de bepalingen van de afstervingsnelheid (C_0) toont aan dat de waarde C_0 in de meeste gevallen lager ligt dan de waarde van TB, het verschil is echter gering. De gemiddelde ratio tussen beide grootheden bedraagt 1,24 en zij vertonen een redelijk lineair verband ($r^2 = 0,86$). Vergelijking van de gevonden MAC 4uur waarden met de MRC l.i. laat zien dat de MRC l.i. circa $2 \times (1 - 4)$ zo groot is als de MAC 4uur. De relatie tussen beide grootheden is zwak ($r^2 = 0,79$). De ratio tussen MRC en MAC 4uur voor de in dit onderzoek bestudeerde *E.coli* stammen, wijkt sterk af van door andere onderzoekers gevonden ratio's. Lorian en De Freitas ⁵³ vonden een ratio van circa 21 ($SD = 6,9$), terwijl Ezrow e.a. ⁶⁰ een ratio van 9,4 ($2 - 24$) waarnamen voor de combinatie *E.coli* en ampicilline. Voor een deel kunnen de lage ratio's worden verklaard door de kortere incubatietijd, welke werd toegepast. In dit onderzoek bedroeg de incubatietijd 4 uur, Ezrow e.a. incubeerde 6 uur en Lorian en De Freitas 5,5 uur.

Op grond van de uitkomsten voor de met verschillende methodieken bepaalde grensconcentraties en de tussen deze parameters gevonden statistisch significante correlaties, kan gesteld worden dat het inzicht in de relatieve in-vitro gevoeligheid van *E.coli* bacteriën voor ampicilline tamelijk onafhankelijk is van de gevolgde methodiek. In absolute waarde

gezien geven de gevolgde methodieken echter wezenlijke verschillen te zien.

Uit de in dit onderzoek bepaalde curven van groei en sterfte (zie Figuur VI-6 A en VI-7 A) is duidelijk komen vast te staan, dat stammen van één bacteriesoort aanleiding kunnen geven tot curven met een verschillend verloop. De latente periode na toevoeging van het antibioticum vertoont zowel per stam als voor één stam bij verschillende antibioticum concentraties aanzienlijke verschillen. Deze periode weerspiegelt waarschijnlijk enerzijds het verdelingsproces van ampicilline over de bacteriën en anderzijds de tijd benodigd voor de inwerking van het antibioticum op de bacterie. Op deze aanpassingsperiode volgt een periode waarin er een semi-logaritmisch verband bestaat tussen het aantal CFU/ml en de tijd. Als de concentratie van het antibioticum niet te hoog is en de waarnemingen lang genoeg worden voortgezet, ziet men het lineaire verloop in de tijd ombuigen en een fase van hernieuwde exponentiële groei optreden. Garrett en Chong Min Won hebben aangetoond dat hierbij 2 factoren een rol spelen ⁶¹. Enerzijds is deze groei het gevolg van een overgroei door resistentere bacteriën uit de populatie, anderzijds bleek de antibioticum concentratie ten gevolge van verbruik en/of afbraak te zijn afgenomen.

Door Mattie is een model beschreven waarmee vanaf het tijdstip van toevoeging van het antibioticum tot het moment waarop de overgroei manifest wordt, de sterfte-curven voor β -lactam antibiotica beschreven kunnen worden ⁶². Hij gebruikt hiervoor de vergelijking $\ln N_t = \ln N_0 + k_0 t - \frac{1}{2} a t^2$, waarbij N_t = aantal CFU/ml op tijdstip t ; N_0 = aantal CFU/ml op tijdstip $t = 0$; k_0 = groeiconstante en a = inhibitieconstante. Met deze functie wordt het verloop van de curven benaderd door een parabool. De in deze studie verkregen groei-/sterfte-curven konden echter met deze functie niet benaderd worden. De waarnemingen weken te veel af van de voorgestelde curve. Door enkel de fase waarin een logaritmische groei of sterfte werd waargenomen in beschouwing te nemen, kan weliswaar onder weglating van een deel van de verkregen informatie voor iedere concentratie de groei- of sterfte-curve worden weergegeven door één parameter namelijk de ogenschijnlijke afstervingssnelheidsconstante (k_a). Tussen deze parameter en de concentratie ampicilline bleek een verband te bestaan dat kon worden weergegeven met de vergelijking:

$$k_a = k_0 - (k_0 - k_a) \max x \{1 - \exp - \alpha (C - C_0)\} \text{ voor } C \geq C_0.$$

Om praktische redenen (het vermijden van negatieve waarden) werd gekozen voor ko-ka als parameter in plaats van ka. Uit de Figuren VI-6 B en VI-7 B bleek duidelijk dat de waarnemingspunten zeer goed samenvallen met de voorgestelde curven. In het verloop van ko-ka versus C zijn 3 fasen te onderkennen: het concentratie traject van $0 \rightarrow C_0$ waarin de waarde van ka niet verschilt van de waarde van ko, het traject waarin ka afneemt met de concentratie en het traject boven een bepaalde concentratie waarin de waarde van ka niet meer verandert.

Zowel Garrett en Chong Min Won die de invloed van penicilline G op *E.coli* ⁶¹, als Elkhoully en Führer die de invloed van ampicilline op *E.coli* onderzochten ⁶³, hebben zich beperkt tot relatief lage concentraties, waardoor zij het optredende verzadigingseffect niet hebben waargenomen. Wel vonden beide groepen onderzoekers een specifieke grensconcentratie waaronder geen effect optrad. Voor het verband tussen ko-ka versus de concentratie boven de waarde $C = C_0$ vonden beide groepen een lineair verband. Er lijkt dus een discrepantie te bestaan met de in deze studie beschreven resultaten. Indien men echter de in dit model voorgestelde exponentiële functie vervangt door de eerste term uit de Taylorreeksontwikkeling verkrijgt men de volgende vergelijking:

$$\begin{aligned} ka &= ko - (ko-ka) \max \{1 - 1 + \alpha (C-C_0)\} \\ &= ko - (ko-ka) \max \alpha (C-C_0) \\ &= ko - \text{constante} \times (C-C_0). \end{aligned}$$

Deze vergelijking is identiek aan het door Garrett en Chong Min Won voorgestelde verband.

Doordat met behulp van de voorgestelde functie het groei/sterfte patroon is vastgelegd door de parameters ko, ka max, α en C_0 , is een nadere analyse van de verbanden onderling en met de parameters uit de andere test-systemen mogelijk geworden. Reeds eerder is gewezen op de relatie tussen C_0 en de parameters MRC, MAC 4uur en TB . Er bleek geen relatie aanwezig te zijn tussen ko en ka max, tussen ko en α , noch tussen ka max en α . Evenmin is er een verband tussen de MRC en de beide snelheidsbepalende parameters. De conclusie is dan ook gerechtvaardigd, dat de snelheid waarmee de interactie tussen de bacteriën en het antibioticum zich afspeelt niet tot uiting komt in de MRC. Welke oorzaak gezocht moet worden achter het verschillende gedrag van de individuele *E.coli* stammen op het toevoegen van ampicilline aan het medium, is op dit moment nog duister. Door Scudamore e.a. is aangetoond dat de buiten-membraan van

E.coli K 12 een penetratie barrière vormt voor o.a. ampicilline ⁶⁴. Het is mogelijk dat de hier geteste stammen buiten-membranen van verschillende samenstelling bezitten. Ook is bekend, dat *E.coli* bacteriën tenminste 6 penicilline bindende eiwitten bezitten welke mogelijke aangrijpingspunten zijn voor de ampicilline werking ⁶⁵. Een verklaring voor het verschillende gedrag van de afzonderlijke stammen is dan wellicht terug te voeren tot een verschil in affiniteit en/of mate van aanwezigheid van deze eiwitten. Tenslotte kan opgemerkt worden, dat bij onderzoek bij *S.aureus* gevonden is dat lysis door een autolytisch systeem van deze bacteriën, een wezenlijke bijdrage levert aan het afsterven der bacteriën ⁶⁶, zodat ook verschillen in autolytische systemen een mogelijke oorzaak voor verschillend gedrag van afzonderlijke stammen kunnen vormen.

De confrontatie van de MRC l.i. met de theoretisch berekende minimaal remmende concentratie C^* uit de afstervingsexperimenten toonde tussen beide concentraties een ratio van circa 2. Aangezien in deze studie geen bouillon-dilutiemethode voor de MRC bepaling is toegepast, kan niet worden uitgesloten dat het verschil veroorzaakt wordt door verschillen in de toegepaste kweekmethoden. Sherris toonde aan dat er verschillen kunnen bestaan tussen de uitkomsten van de agar-dilutie- en de bouillon-dilutiemethode ⁵⁹.

Het antagonisme dat optreedt indien chlooramfenicol en ampicilline beide inwerken op bacteriën wordt verklaard door aan te nemen, dat het ampicilline zijn dodende werking niet kan uitoefenen omdat de groei van de cellen reeds geremd is door het chlooramfenicol. Om te bestuderen of ook met dit model een relatie te vinden is tussen groeisnelheid en werking van ampicilline is bekeken welke invloed een wijziging in de incubatie temperatuur tot gevolg had. Duidelijk kwam naar voren dat temperatuur verlaging inderdaad tot uiting komt in de groeisnelheid der bacteriën. De beide geteste stammen bleken echter enigszins verschillend te reageren (Tabel VI-6). *E.coli* TO 13 vertoont het verwachte effect, zowel (ko-ka) max als α kregen lagere waarden bij afnemende groeisnelheid. TO 41 echter vertoont bij de overgang van 37°C op 30°C wel en bij de overgang van 30°C naar 22°C geen daling in (ko-ka) max. Bij beide overgangen daalt wel de waarde van α . Opvallend is ook de verhoging in Co welke voortvloeit uit de temperatuur verlaging. Aangezien niet verwacht mag worden dat verlaging in de incubatie temperatuur aanleiding zal zijn

tot een verandering in structuur en samenstelling der bacteriën, moet in dit resultaat een bevestiging worden gezien van de stelling dat de metabole-activiteit der bacteriën een maat is voor de effectiviteit van de antibioticum inwerking. Hiertegenover staat echter dat bij 37°C de verschillende stammen een verschillende groeisnelheid kunnen vertonen, maar dat deze verschillen niet weerspiegeld worden in de k_a max en de α . Blijkbaar spelen hier andere factoren mede een belangrijke rol.

Als conclusie van dit onderzoek kan gesteld worden, dat de bepaling van de afstervingsnelheid het meeste inzicht verschaft in de interactie tussen de bacteriën en het antibioticum. Immers, hierbij wordt, naast informatie omtrent een grensconcentratie ook informatie over de snelheid der processen verkregen. In het verdere verloop van dit onderzoek zal nader worden bekeken in welke mate dit inzicht ook kan bijdragen tot het begrijpen van de resultaten van de antimicrobiële bestrijding van infecties.

ONDERZOEK NAAR DE EIGENSCHAPPEN VAN *E. COLI* STAMMEN WELKE DE IN-VIVO
GEVOELIGHEID (MEC) BEPALEN.

Inleiding.

In het bacteriologisch laboratorium wordt regelmatig de in-vitro gevoeligheid voor antibiotica bepaald van bacteriestammen geïsoleerd bij urineweg- of andere infecties. Bij het instellen van de behandeling wordt met de uitkomsten van deze bepalingen rekening gehouden. Men gaat er daarbij vanuit dat er een correlatie bestaat tussen de in-vitro gevoeligheid voor een antibioticum en het effect dat men *in vivo* met dat middel kan bereiken. Experimenteel is echter niet met zekerheid vastgesteld dat een dergelijke correlatie bestaat.

Bij de behandeling van patiënten met urineweginfecties bestaat de extra moeilijkheid, dat men rekening moet houden met twee soorten spiegels^{67, 68, 69}. Vele antibiotica worden via de nier uitgescheiden zodat de spiegels van deze middelen in de urine vele malen hoger zijn dan de spiegels in het bloed. Bij de bestrijding van urineweginfecties wordt dan ook onderscheid gemaakt tussen infecties die zich tot het lumen beperken en infecties waarbij het parenchym aangetast is. Voor de genezing van de infecties die zich tot het lumen beperken is de urine concentratie maatgevend, terwijl bij de aantasting van het nierparenchym de serum spiegel van belang wordt geacht.

Eudy vergeleek met behulp van een litteratuurstudie de uitkomsten van gevoeligheidsbepalingen met de resultaten van de behandeling⁷⁰. Uit de door hem uitgevoerde statistische analyse bleek niet dat er een correlatie bestaat tussen gevoeligheid *in vitro* en genezing.

Burrous e.a. behandelden experimentele pyelonefritis met verschillende antibiotica⁷¹. Zij vonden geen correlatie tussen het resultaat van de therapie, antibiotica spiegels in de urine en de MRC van de infecterende stam. Deze beide studies hebben speciaal betrekking op urineweginfecties. Meer in het algemeen wordt veelvuldig gebruik gemaakt van de

zogenaamde muis protectie test om *in vivo* een therapeutisch effect te bepalen.

Bij deze test wordt de dosis benodigd om 50% van de geïnfecteerde muizen te beschermen tegen een lethale intra-peritoneale toediening, van micro-organismen berekend (ED 50). De gevonden ED 50 waarde kan nu rechtstreeks ^{72,73}, of via een hiervan af te leiden topspiegel ^{74,75} worden vergeleken met de MRC. Bij geen van deze studies bestond er een correlatie tussen MRC en ED 50 of topspiegel.

Zelfs als men de gastheer factoren buiten beschouwing laat, kunnen een groot aantal factoren de uitkomsten van de infectie-bestrijding beïnvloeden. Zo toonden Merrikin en Rolinson aan dat het effect van een éénmalige dosis met een hoge serum spiegel soms kleiner is dan van 5 deeldoses met lagere serum spiegels ⁷⁴. Comber e.a. verklaren de betere werking van amoxycilline ten opzichte van ampicilline in de door hun gekozen proefopstelling door de snellere bactericide werking van eerstgenoemd middel ⁷⁶. Experimentele infecties met *E.coli* stammen van gelijke gevoeligheid kunnen verschillend reageren op de behandeling op grond van virulentie verschillen tussen de stammen. Uit de literatuur is geen inzicht te verkrijgen over de invloed van de virulentie van de bacterie op het in-vivo effect van het antibioticum. Auteurs die werken met een standaard inoculum vermelden geen virulentie-gegevens, terwijl auteurs die de virulentie bepalen, het inoculum aanpassen aan de hoogte van de LD 50 ^{75,77,78}. Uit de studie van Nicas en Bryan kan men afleiden dat bij gebruik van een gelijk inoculum, het virulentie verschil tot uiting komt in de ED 50 ⁷⁷.

In dit hoofdstuk worden de in-vivo en in-vitro resultaten uit ons eigen onderzoek met elkaar vergeleken. Het doel is te onderzoeken in hoeverre de in-vivo gevoeligheid (MEC) te correleren is met de factoren, welke samenhangen met de antibioticum werking, de in-vitro gevoeligheid (MRC) en de afstervingsnelheid en met de factor welke samenhangt met de afweerwerking, de virulentie.

Methoden.

Experimentele materialen en methoden. Hiervoor wordt verwezen naar de secties materialen en methoden van de voorgaande hoofdstukken.

Vergelijking MEC en MRC. De vergelijking tussen gevoeligheid *in vitro* (MRC) en *in vivo* (MEC) wordt uitgevoerd in de vorm van een ratio-

berekening (MRC/MEC). Een ratio groter dan 1 betekent dat de stam *in vivo* een grotere gevoeligheid vertoont dan *in vitro*. Een ratio lager dan 1 betekent dat de stam *in vivo* ongevoeliger is dan op grond van het in-vitro resultaat werd verwacht.

Vergelijking MEC met MRC en afstervingsnelheid. Voor het betrekken van de in-vitro afstervingsnelheidsgegevens bij de vergelijking *in vivo* - *in vitro* is zowel de waarde van α , als die van k_a max van belang. De factor α bepaalt samen met de grootte (ko-ka) max de richtingscoëfficiënt in het punt C = Co van de curve, die het verloop van de afstervingsnelheidsconstante (k_a) met de concentratie beschrijft. De waarde k_a max is de k_a bij de maximaal bereikbare afstervingsnelheid. Uitgaande van de waarden α en k_a max werd voor iedere stam een tweetal correctiefactoren berekend: $f \alpha$ en $f k_a$. Deze correctie factoren $f \alpha$ en $f k_a$ geven de onderlinge ratio's weer van de α en de k_a max van de verschillende *E.coli* stammen ten opzichte van de waargenomen minimale waarde van α en k_a max. Op deze wijze werden dimensieloze factoren gecreëerd. Met behulp van deze factoren werd een nieuwe ratio berekend: $MRC / (MEC \times f \alpha \times f k_a)$, waarin de afstervingsnelheid is verdisconteerd. *Statistiek.* Voor het statistisch toetsen op significantie is gebruik gemaakt van de verdelingsvrije toets van Wilcoxon. De waarden van α zijn opgegeven voor een éénzijdige overschrijdingskans.

Resultaten.

In Hoofdstuk VI werden de in-vitro afstervingsexperimenten beschreven, de uitkomsten van de parameters α en k_a max zijn weergegeven in Tabel VII-1. Uitgaande van deze waarden werden correctie factoren $f \alpha$ en $f k_a$ berekend. De waarden van deze factoren worden eveneens in Tabel VII-1 vermeld.

Uitgaande van de in de Hoofdstukken V en VI vermelde waarden van de gevoeligheidsparameters MEC en MRC l.i. werd de ratio MRC l.i./MEC berekend. Met behulp van de correctiefactoren $f \alpha$ en $f k_a$ werd een nieuwe ratio berekend, waarin de invloed van de afstervingsnelheid is verdisconteerd. In Tabel VII-2 zijn voor de 20 bij deze vergelijking betrokken *E.coli* stammen de virulentie-indeling, de waarden van de MEC, de MRC l.i., de ratio MRC l.i./MEC en de ratio MRC l.i./($MEC \times f \alpha \times f k_a$) weergegeven.

De vergelijking *in vivo* - *in vitro* op basis van de MRC l.i./MEC ratio

Tabel VII-1. Afstervingsnelheidsparameters en de hieruit afgeleide correctiefactoren $f \alpha$ en $f ka$.

<i>E.coli</i> TO nr.	α^1 ml/ μ g	$ka \max^2$ uur ⁻¹	$f \alpha^3$	$f ka^4$
3	0,7	- 10,6	2,3	1,3
4	0,3	- 9,8	1,0	1,2
5	0,5	- 13,3	1,7	1,7
6	0,5	- 9,3	1,7	1,2
8	0,6	- 9,6	2,0	1,2
10	0,8	- 10,0	2,7	1,2
13	1,6	- 12,4	5,3	1,6
15	2,3	- 10,1	7,7	1,3
19	1,2	- 9,0	4,0	1,1
21	0,4	- 8,0	1,3	1,0
30	0,6	- 11,0	2,7	1,4
31	1,2	- 11,3	4,0	1,4
33	0,5	- 10,9	1,7	1,4
34	0,4	- 10,4	1,3	1,3
35	0,4	- 9,8	1,3	1,2
37	0,4	- 13,1	1,3	1,6
40	2,0	- 11,9	6,7	1,5
41	1,1	- 11,0	3,7	1,4
42	0,6	- 12,9	2,0	1,6
45	0,7	- 12,9	2,3	1,6

¹ α = een factor, bepalend voor de richtingscoëfficiënt van de curve.

² $ka \max$ = maximale afstervingsnelheidsconstante.

³ $f \alpha$ = $\alpha/0,4$.

⁴ $f ka$ = $ka/-8,0$.

leert dat er geen direct lineair verband bestaat tussen de MRC l.i. en de MEC. Zou deze correlatie aanwezig zijn, dan zou immers voor alle stammen de ratio gelijk moeten zijn. Naast de in-vitro gevoeligheid moeten er andere factoren zijn die bijdragen aan de totstandkoming van de MEC waarde. De waargenomen ratio's vertonen een grote spreiding welke varieert van 0,9 voor *E.coli* TO 34 tot 213,3 voor TO 42. Opvallend is

Tabel VII-2. *Vergelijking in vivo - in vitro.*

I. *Relatie op basis van de MRC l.i. waarbij geen (A) en wel (B) rekening wordt gehouden met de afstervingsnelheidsgegevens.*

<i>E.coli</i> TO nr.	Vir. ¹	A			B
		MEC ² µg/ml	MRC l.i. ³ µg/ml	MRC l.i. MEC	MRC l.i. ⁴ MEC x f α x f ka
3	I	0,13	1,8	13,8	4,6
4	I	0,28	5,7	20,4	17,0
5	I	1,47	3,6	2,4	0,8
6	I	0,02	3,6	180,0	88,2
8	II	1,47	6,9	4,7	2,0
10	III	0,28	1,3	4,6	1,4
13	III	0,13	1,1	8,5	1,0
15	III	0,02	1,6	80,0	8,0
19	I	0,13	1,8	13,8	3,1
21	I	0,02	3,1	155,0	119,2
30	II	0,02	2,6	130,0	34,4
31	III	0,28	2,3	8,2	1,5
33	III	0,06	3,2	53,3	22,4
34	III	3,47	3,2	0,9	0,5
35	III	0,06	2,7	45,0	28,8
37	I	0,13	3,0	23,1	11,1
40	III	0,13	1,9	14,6	1,4
41	I	0,02	2,8	140,0	27,0
42	I	0,01 ⁵	3,2	213,3	66,7
45	III	0,06	2,0	33,3	9,0

¹ Vir. I = a-virulente stammen; II = nier-pathogene stammen;

III = virulente stammen (zie hoofdstuk V).

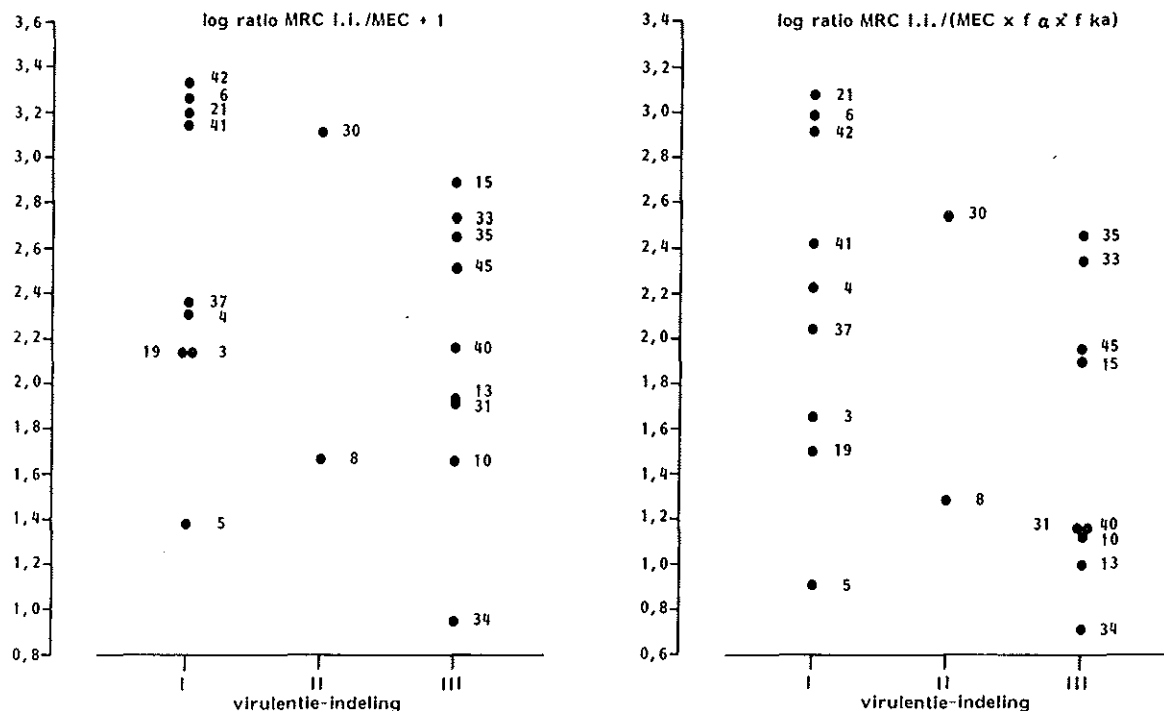
² MEC = minimaal effectieve concentratie.

³ MRC l.i. = minimale remmingsconcentratie, bepaald via een agar-verdunningsmethodiek; l.i. = laag inoculum.

⁴ f α en f ka = zie Tabel VII-1.

hierbij dat met uitzondering van *E.coli* TO 34 alle stammen een ratio boven de waarde 1 bezitten, met andere woorden de gevoeligheid *in vivo* is voor deze stammen groter dan de in-vitro gevoeligheid.

Figuur VII-1. *Vergelijking in-vivo en in-vitro resultaten. Per E.coli stam is weergegeven het verband tussen de ratio MRC l.i./MEC, respectievelijk de ratio MRC l.i./ $(MEC \times f \alpha \times f ka)$ en de virulentie indeling der E.coli stammen.*

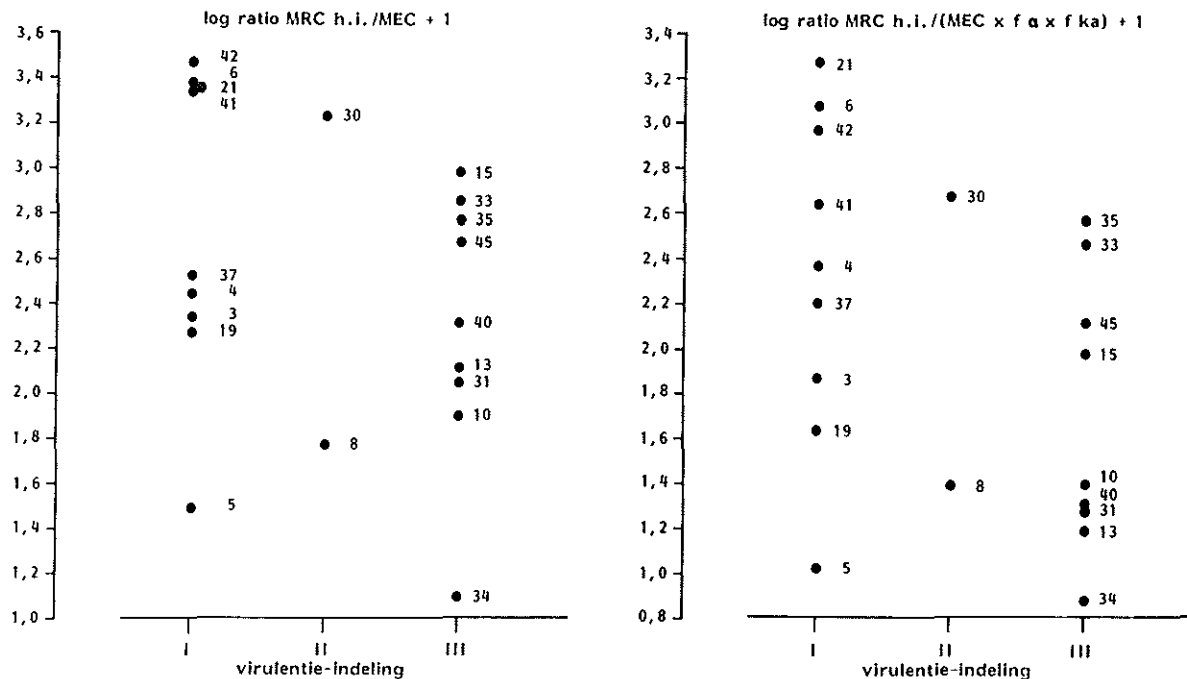


I = a-virulente stammen; II = niet pathogene stammen; III = virulente stammen
 MEC = minimaal effectieve concentratie; MRC l.i. = minimale remmingsconcentratie, bepaald via een agar-verdunningsmethode; l.i. = laag inoculum.
 $f \alpha = \alpha/0,4$; α = een factor, bepalend voor de richtingscoëfficiënt van de afstervingscurve.
 $f ka = ka/-8,0$; ka = maximale ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante.

Zet men grafisch de waarde van MRC l.i./MEC per stam uit tegen de virulentie-groep waartoe de stam behoort, dan verkrijgt men het patroon dat weergegeven is in Figuur VII-1, links. Ook per virulentie-groep blijken de stammen onderling een grote spreiding in de ratio's te vertonen. De toets van Wilcoxon, toegepast op de verdelingen voor de a-virulente en virulente groep, levert echter geen significant verschil tussen beide groepen op ($\alpha > 0,05$). Nadere bestudering der ratio's per virulentie-groep levert het volgende resultaat op. De a-virulente groep blijkt te bestaan uit tenminste 2 groepen. Een groep bestaande uit TO 6, 21, 41 en 42 die zeer gevoelig is *in vivo* met ratio's boven de 100 en een groep die minder gevoelig is met ratio's beneden de waarde 25. *E.coli* TO 5 vormt een weinig gevoelige uitschieter met een ratio van 2,4. De beide stammen van de nier-pathogene groep II gedragen zich geheel verschillend. *E.coli* TO 30 blijkt zeer gevoelig en TO 8 slechts weinig gevoelig *in vivo* te zijn. De virulente groep vertoont een continue verdeling der ratio's, variërend van 0,9 voor TO 34 tot 80,0 voor TO 15. *E.coli* TO 34 vormt in deze groep een ongevoelige uitschieter met een ratio kleiner dan 1.

De invoering van de afstervingsgegevens in de vergelijking *in vivo* - *in vitro* met behulp van de correctie factoren f_{α} en f_{ka} leidt niet tot gelijke ratio's voor de stammen. Aannemende dat terecht een lineair verband is verondersteld, moet geconcludeerd worden dat andere factoren naast de in-vitro gevoeligheid en de afsterving de MEC bepalen. De ratio's variëren nu van 0,5 voor *E.coli* TO 34 tot 119,2 voor TO 21. De waargenomen ratio's zijn per virulentie-groep weergegeven in Figuur VII-1 rechts. Toepassing van de toets van Wilcoxon levert nu een significant verschil tussen de a-virulente en virulente groep (éénzijdige toetsing $\alpha = 0,05$). Waarmee het meer aannemelijk is geworden dat de virulentie mede bepalend is voor de waarde van de MEC. Bestudering van de ratio's per virulentie-groep levert het volgende beeld op. De a-virulente groep I stammen blijken nog steeds uit tenminste twee groepen te bestaan. Enerzijds *E.coli* TO 6, 21 en 42 met ratio's boven de waarde 50 en anderzijds een groep met ratio's onder de waarde 30. *E.coli* TO 5 vormt ook nu nog een uitschieter met een ratio van 0,8. De beide groep II stammen vertonen nog steeds twee geheel verschillende ratio's: 34,4 voor TO 30 en 2,0 voor TO 8. De virulente groep vertoont nu eveneens een opsplitsing. *E.coli* TO 15, 33, 35 en 45 vormen een groep met ratio's tussen de waarden

Figuur VII-2. *Vergelijking in-vivo en in-vitro resultaten. Per E.coli stam is weergegeven het verband tussen de ratio MRC h.i./MEC, respectievelijk de ratio MRC h.i. / (MEC x f a x f ka) en de virulentie indeling der E.coli stammen.*



I = a-virulente stammen; II = niet pathogene stammen; III = virulente stammen
 MEC = minimaal effectieve concentratie; MRC h.i. = minimale remmingsconcentratie, bepaald via een agar-verdunningsmethode; h.i. = hoog inoculum.
 $f a = a/0,4$; a = een factor, bepalend voor de richtingscoëfficiënt van de afstervingscurve.
 $f ka = ka/-8,0$; ka = maximale ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante.

8 en 29, terwijl de andere stammen ratio's onder de waarde 2 hebben. *E.coli* TO 34 heeft in deze groep nog steeds de laagste ratio: 0,5.

Vergelijking van de beide patronen in Figuur VII-1 leert dat door de invoering van de afstervingsgegevens alle ratio's kleiner zijn geworden en dat *E.coli* TO 41 (a-vir.) en TO 10, 13, 31 en 40 (vir.) relatief verschoven zijn. *E.coli* TO 41 is van de zeer gevoelige groep verplaatst naar de groep matig gevoelige a-virulente stammen. De genoemde virulente stammen zorgen voor de opsplitsing in deze groep.

Op analoge wijze als hierboven voor de MRC l.i. werd beschreven is ook het verband met de MRC h.i. onderzocht. In Tabel VII-3 zijn behalve de uitgangsgegevens de waarden der berekende ratio's $MRC\ h.i./MEC$ en $MRC\ h.i./(MEC \times f \alpha \times f\ ka)$ vermeld. Grafisch zijn deze ratio's per virulentie-groep weergegeven in Figuur VII-2. Vergelijking van Figuur VII-1 en VII-2 laat zien welke invloed de verhoging van het inoculum heeft op de verhouding tussen de in-vitro en in-vivo gevoeligheid. Vergelijking van de ratio's MRC/MEC in de Figuren VII-1 en VII-2 leert, dat het patroon nauwelijks verschilt. Vergelijking van de ratio's $MRC/(MEC \times f \alpha \times f\ ka)$ in de Figuren VII-1 en VII-2 geeft wel enige verandering te zien. De opsplitsing binnen de a-virulente groep is minder uitgesproken door de grotere spreiding in de sub-groepen. Het verschil tussen de a-virulente en virulente stammen is in het geval van het hoge inoculum toegenomen, hetgeen blijkt uit de toets van Wilcoxon. De α blijkt nu tussen 0,025 en 0,05 te liggen.

Vervanging van de MRC waarden door de waarde van Co uit de afstervings-experimenten geeft slechts een verschuiving in het patroon der ratio's te zien (niet weergegeven). Een ratio kleiner dan 1 wordt nu behalve bij *E.coli* TO 34 ook waargenomen bij TO 5 en TO 8.

Met behulp van de in Hoofdstuk V vermelde gegevens betreffende de hemolysine-productie, de aanwezigheid van pili en de serotypering is onderzocht of de ratio's correleerden met deze gegevens. Dit bleek niet het geval te zijn.

In het kader van de vergelijking *in vivo* - *in vitro* is ook onderzocht of de MRC waarde in relatie staat tot de virulentie van een stam. In Figuur VII-3 wordt een grafische weergave gegeven van het verband tussen de MRC h.i. en de virulentie der stammen. Hierbij valt op dat de virulente stammen relatief lage MRC's hebben, terwijl de a-virulente stammen hoge MRC's vertonen. Toepassing van de toets van Wilcoxon toont

Tabel VII-3. *Vergelijking in vivo - in vitro.*

II. *Relatie op basis van de MRC h.i., waarbij geen (A) en wel (B) rekening wordt gehouden met de afstervingsnelheidsgegevens.*

<i>E.coli</i> TO nr.	Vir. ¹	A			B
		MEC ² µg/ml	MRC h.i. ³ µg/ml	MRC h.i. MEC	MRC h.i. ⁴ MEC x f α x f ka
3	I	0,13	2,9	22,3	7,5
4	I	0,28	7,9	28,2	23,5
5	I	1,47	4,6	3,1	1,1
6	I	0,02	4,9	245,0	120,1
8	II	1,47	8,6	5,8	2,4
10	III	0,28	2,2	7,9	2,4
13	III	0,13	1,7	13,1	1,5
15	III	0,02	1,9	95,0	9,5
19	I	0,13	2,5	19,2	4,4
21	I	0,02	4,8	240,0	184,6
30	II	0,02	3,5	175,0	46,3
31	III	0,28	3,2	11,4	2,0
33	III	0,06	4,2	70,0	29,4
34	III	3,47	4,4	1,3	0,8
35	III	0,06	3,5	58,3	37,4
37	I	0,13	4,4	33,8	16,3
40	III	0,13	2,7	20,8	2,1
41	I	0,02	4,5	225,0	43,4
42	I	0,01 ⁵	4,5	300,0	93,8
45	III	0,06	2,9	48,3	13,1

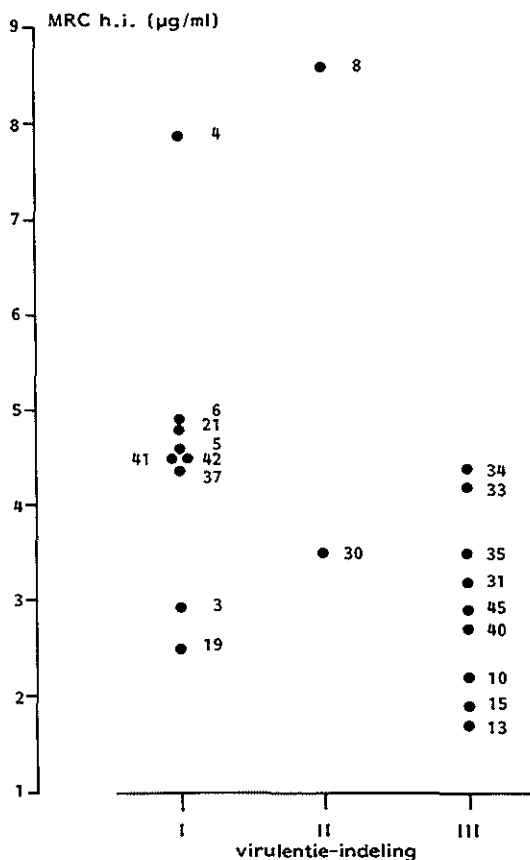
¹ Vir. I = a-virulente stammen; II = niet-pathogene stammen;
III = virulente stammen (zie hoofdstuk V).

² MEC = minimaal effectieve concentratie.

³ MRC h.i. = minimale remmingsconcentratie, bepaald via een agar-verdunningsmethodiek; h.i. = hoog inoculum.

⁴ f α en f ka = zie Tabel VII-1.

Figuur VII-3. *Vergelijking in vivo en in vitro resultaten. Per E.coli*
stam is weergegeven het verband tussen de in-vitro gevoelig-
heid als minimaal remmende concentratie bij hoog inoculum (MRC h.i.) en
de virulentie klassering (I = a-virulent; II = nier-pathogeen, III =
virulent.



ten aanzien van de MRC een significant verschil aan tussen de a-virulente en virulente groep ($\alpha < 0,01$). Een vergelijkbaar doch minder uitgesproken beeld vertoont de MRC l.i. versus de virulentie ($0,025 < \alpha < 0,05$).

Discussie.

Bij de aanvang van deze studie werd verondersteld, dat de in-vivo gevoeligheid bepaald zou worden door de in-vitro gevoeligheid, de afsterfing, de virulentie der stammen en eventueel andere nog onbekende factoren. Uit het vergelijkend onderzoek met de thans beschikbare gegevens

is het niet mogelijk gebleken een verband te vinden tussen de parameters MEC, MRC, α en $k_{a \max}$ en de virulentie van de stammen. Het niet vinden van dit verband hoeft echter geenszins te betekenen, dat er geen verband is. Immers, de factoren welke de MEC bepalen kunnen elkaar tegengesteld beïnvloeden. Ook de afwezigheid van gradaties binnen een virulentie-groep, die naar alle waarschijnlijkheid wel bestaan, bemoeilijkt de analyse. De grote spreiding der ratio's binnen de virulentie-groepen na correctie voor de afstervingsnelheid doet vermoeden dat naast de onderzochte parameters andere factoren een rol spelen. Bij deze vergelijking is er vanuit gegaan dat er lineaire relaties bestaan tussen de in-vivo gevoeligheid en de overige parameters. Het is echter mogelijk dat deze veronderstelling niet juist is. Een discriminant analyse zou hierover uitsluitsel kunnen geven. Een dergelijke analyse werd echter gezien de weinig gedifferentieerde informatie over de virulentie van de stammen en het vermoeden dat andere factoren een rol spelen in dit stadium niet opportuun geacht.

De opsplitsing der stammen welke zowel binnen de a-virulente als de virulente groep optreedt, is wellicht terug te voeren tot het al of niet bestaan van een synergistisch effect tussen de serum bactericidie en/of de fagocytose en de werking van een antibioticum. Een aantal onderzoekers toonden aan dat serum en antibioticum ten opzichte van sommige stammen wel en voor andere geen synergisme vertoonden ^{72,79,80,81,82,83}

Ook het niet kunnen aantonen van correlaties tussen de waarde van de MRC/MEC ratio en hemolysine productie, aanwezigheid van pili of de serotypen sluit niet uit dat dergelijke correlaties bestaan en niet tot uiting kunnen komen onder invloed van andere factoren. Van de hemolysine productie kan worden verwacht, dat zij van betekenis is voor het verloop van de infectie. Immers, hemolysinen bevorderen necrose. Gemmel toonde aan dat antibiotica de productie van toxinen door *Staphylococcus aureus* kan remmen ⁸⁴. Indien dit fenomeen ook geldt voor *E.coli* zou dit het ontbreken van een correlatie kunnen verklaren. Pili spelen een rol bij de aanhechting. Omdat de aanhechting in het model dat hier werd bestudeerd waarschijnlijk geen rol van betekenis speelt, bestond er weinig kans op correlatie met de waarde van de MRC/MEC ratio. Het aantal geteste stammen is te gering geweest om een verband te kunnen leggen tussen de MRC/MEC ratio en bepaalde serotypen.

Zoals in de inleiding reeds werd gesteld, wordt als in-vivo test veel-

al de muis-protectietest toegepast. Daarnaast wordt door de meeste onderzoekers slechts één stam onderzocht met verschillende antibiotica. In die gevallen waarin meerdere stammen binnen één soort werden getest, kwam net als in deze studie naar voren dat de ratio tussen de gevoeligheid *in vivo* en *in vitro* per stam sterk kan variëren ^{72,73,77}.

Uit de studies van Nicas en Bryant ⁷⁷ en van Davis ⁷⁸ valt af te leiden dat de virulentie een factor is, die de waarde van de ratio ED 50/MRC mede bepaalt. Deze onderzoekers corrigeren hun inoculum aan de hand van de in een virulentietest bepaalde LD 50. Voor iedere stam wordt aldus een inoculum van een bepaald aantal malen de LD 50 waarde toegepast. Zij tonen aan dat wijziging van het inoculum van een stam leidt tot verschillen in de ED 50 waarde en noemen dit een inoculum-effect. Wellicht is deze term correct voor de muis-protectietest, omdat hier het aantal bacteriën inderdaad bepaald wordt door het ingespoten inoculum. Bij proefopstellingen, waarbij men werkt met volledig aangeslagen infecties waarbij een sterke vermenigvuldiging van de bacteriën in het weefsel plaatsvindt, is het mijns inziens juist te spreken van een virulentie-effect.

De waarneming dat de virulente stammen *in vitro* significant gevoeliger waren voor ampicilline dan de a-virulente stammen, dient voorzichtig geïnterpreteerd te worden. Immers, het onderzoek betrof slechts een beperkt aantal stammen. Een verklaring voor het waargenomen verschil zou gevonden kunnen worden in de hypothese, dat de a-virulente stammen afkomstig zijn van chronische infecties, waarvan de verwekkers veelal a-virulent zijn en veel in contact zijn geweest met antibiotica. Ten gevolge hiervan zijn zij langzamerhand wat minder gevoelig geworden.

Naast de conclusie dat er geen uitspraken over correlatie tussen *in-vitro* en *in-vivo* gevoeligheid gedaan kunnen worden, valt in deze studie op, dat op één na alle stammen *in vivo* reageren op sub-MRC concentraties van het ampicilline. Op drie stammen na reageren de stammen zelfs op een concentratie, die *in vitro* geen meetbaar effect op de groei vertoont (Co). Protectie door sub-MRC concentraties werd eerder aangetoond door Merrikin en Rolinson en door Zak en Kradolfer bij de muis-protectietest ^{74,75}. De bij de ED 50 behorende top spiegels bleken sub-MRC concentraties te zijn. Door een aantal auteurs zijn *in-vitro* effecten van sub-MRC concentraties beschreven, zoals: groeivertraging ⁸⁵, toenemende gevoeligheid voor fagocytose ⁸¹ en serum bactericidie ⁸⁰, verlaging van het aantal ribosomen per bacterie ⁸⁶, van de aanhechting

aan epitheel-cellen ⁸⁷ en van de productie van extra cellulaire substanties, zoals toxinen ⁸⁴. Ook effecten *in vivo* werden reeds beschreven: verandering van morfologie ⁸⁸ en betere overleving van konijnen na een i.p. infectie met *E.coli* ⁷⁵. Bij dit onderzoek bij konijnen toonden de auteurs een daling aan in het aantal bacteriën van 90% in het peritoneale exudaat na een 6 uur durend infuus, waarbij een concentratie van 1/3 tot 1/8 van de MRC werd gehandhaafd. Therapie startte in deze studie 3 uur na de i.p. toediening van de bacteriën ⁷⁵.

Ofschoon antibioticum spiegelwaarden beneden de MRC bacteriën op velerlei wijzen kunnen beïnvloeden, bleken zij voor de snelheid van het genezingsproces van beperkte waarde. In Hoofdstuk IV werd aangetoond, dat ook serumconcentraties welke boven de MRC waarde van de stam uitgaan niet tot snelle genezing leidden. Zelfs na 4 dagen therapie was de infectie soms nog niet genezen. Er bestaat dus een duidelijke paradox tussen de in-vivo en in-vitro werking. Enerzijds blijkt de infectie te reageren op antibioticum concentraties die *in vitro* geen remming van de groei veroorzaken, anderzijds duurt de volledige verwijdering van de bacteriën zelfs bij hoge concentraties zeer veel langer, dan op grond van de *in vitro* vastgestelde afstervingsnelheid is te verwachten. De uitkomst van de hierboven vermelde studie van Zak en Kradolfer ⁷⁵, waarin zij in hun i.p. model een afname-snelheid in het aantal bacteriën aan toonden die de in-vitro afname-snelheid veel beter benadert dan in ons model, doet vermoeden dat de localisatie van de bacteriën in de in-vivo situatie een doorslaggevende rol speelt. Het is denkbaar, dat de bacteriën in weefsels beter bestand zijn tegen de inwerking van het antibioticum. Zij bevinden zich immers in een osmotisch veel beschermder omgeving. Door een vertraagde stofwisseling zijn zij ongevoeliger (zie Hoofdstuk VI) en als er abscessen zijn, gaat er een beschermende werking uit van pus ⁸⁹. Wellicht dat de rol van het antibioticum zich in feite beperkt tot het voorkomen van uitbreiding van de infectie, terwijl het afweerapparaat van de gastheer zorgt voor de opruiming van de bacteriële verwekker.

Een geheel andere situatie doet zich voor indien de afweer van de gastheer sterk gestoord is. In dat geval kan de infectie alleen worden bestreden als het antibioticum de bacteriën kan doden. Bakker-Woudenberg e.a. toonden aan dat in deze situatie hoge en lang aanhoudende serum spiegels vereist zijn ⁹⁰.

Hoewel de schrijver zich ten volle bewust is van het feit dat de in dit onderzoek waargenomen resultaten slechts gelden voor het onderzochte model, *E.coli* -pyelonefritis bij de rat, geeft een extrapolatie van de bevindingen naar de humane geneeskunde aanleiding tot de volgende opmerking betreffende het gebruik van de in-vitro gevoeligheid (MRC) als indicatie van de effectiviteit van het antibioticum *in vivo*. Op basis van de in deze studie gevonden resultaten kan gesteld worden, dat vermits een verstandige veiligheidsmarge is aangebracht tussen de kritische MRC en de te bereiken serumconcentratie, de traditionele gevoeligheidsbepaling een bruikbare parameter is. Immers, 19 van de 20 stammen reageerden in gunstige zin op concentraties welke gelijk zijn aan de MRC concentratie. Deze conclusie vindt zijn bevestiging in het feit dat gebruik van deze parameter als geleide voor de therapie in de praktijk reeds jaren goede diensten heeft bewezen. Continuering van het gebruik van deze parameter heeft echter ook nadelen. Het gebruik van de in veel gevallen (te) hoge doseringen geeft een verhoogde kans op het optreden van bijwerkingen en draagt bij aan de vervuiling van ons leefmilieu. Het onderzoek naar parameters die de in-vivo gevoeligheid kunnen voorspellen dient dan ook voortgezet te worden.

SAMENVATTING

Antibiotica nemen een centrale plaats in bij de bestrijding van bacteriële infecties. Voor het welslagen van de behandeling dient op de plaats van de infectie gedurende een zekere tijd een bepaalde spiegel van een antibioticum aanwezig te zijn. Deze spiegel wordt bepaald door de in-vivo gevoeligheid van de bacteriestam. In het laboratorium kan de in-vitro gevoeligheid van een bacteriestam voor een antibioticum op relatief eenvoudige wijze worden bepaald. Omdat over de relatie tussen de in-vivo en in-vitro gevoeligheid vrij weinig experimentele gegevens bekend zijn, werd met de in dit proefschrift beschreven studie onderzocht of het mogelijk is op rationele gronden een dosering van een antibioticum aan te geven die kan leiden tot genezing van een infectie met bekende lokalisatie door een bacterie met bekende in-vitro gevoeligheid.

De in-vivo gevoeligheid werd bestudeerd met behulp van een experimentele pyelonefritis bij de rat. De infectie werd teweeggebracht met *E.coli* en bestreden met een continu infuus van ampicilline. Om dit middel langdurig continu toe te dienen was het noodzakelijk een nieuwe infuustechniek te ontwikkelen. Om een vergelijking tussen de in-vitro en in-vivo gevoeligheid mogelijk te maken was het van groot belang te onderzoeken welke ampicilline concentraties aanwezig waren in de infectiehaarden van de cortex van de nier. Voor het vaststellen van deze concentratie werden een drietal technieken aangewend, namelijk analyse van weefselhomogenaten, analyse van renale lymfe en autoradiografie.

Op basis van het hier beschreven infectie- en therapiemodel werd een parameter voor de in-vivo gevoeligheid vastgesteld. In een infectie wordt het resultaat van de behandeling niet alleen bepaald door de inwerking van het antibioticum op de bacteriestam maar ook door de virulentie van de verwekker. Daarom werd de virulentie van de bestudeerde stammen bepaald. Hiertoe werd van een muismodel gebruik gemaakt. Onderzocht werd in hoeverre deze virulentie overeenkwam met het gedrag van de bacteriën

in de rat en of er een relatie te vinden was met de in-vivo gevoeligheid.

Omdat de uitkomst van de in-vitro gevoeligheid afhankelijk is van de gebruikte methode, werden een aantal van deze methoden met elkaar vergeleken. Ook werd de afstervingsnelheid van *E.coli* onder invloed van ampicilline bestudeerd. De resultaten van het in-vitro onderzoek en de virulentie-gegevens werden vervolgens gerelateerd aan de in-vivo gevoeligheid. Hoofdstuk I is gewijd aan een beschrijving van deze vraagstelling en de proefopzet.

Door de proefopzet was het noodzakelijk het ampicilline gedurende 3 tot 7 dagen continu toe te dienen. Omdat het niet mogelijk bleek dit middel zo lang via de bloedbaan in te laten lopen, werd voor dit doel een nieuwe infuustechniek ontwikkeld. Deze techniek werd beschreven in Hoofdstuk II. Het bleek dat wanneer bij de rat een infuus wordt aangesloten op een weefsel-kamer, bij dit dier gedurende 8 dagen een evenwichtsconcentratie in stand gehouden kan worden. De weefsel-kamer dient uit onbuigzaam materiaal te bestaan en moet circa 8 weken voor gebruik onderhuids worden aangebracht. Gedurende deze tijd vindt een inkapseling plaats. Het voordeel van deze techniek is dat gewerkt kan worden met zeer lage infuussnelheden, zonder gebruik te moeten maken van anticoagulantia. Een nadeel vormt de lange inkapselingsperiode, nodig om een optimale uitwisseling van het geneesmiddel met het bloed te verkrijgen.

De methoden van onderzoek naar de intra-renale verdeling van ampicilline werden beschreven in Hoofdstuk III. Bij normale ratten leverden deze methoden de volgende resultaten op. Bij zowel de homogenaat-analyse als de autoradiografie werd aangetoond dat de ampicilline concentratie in de cortex circa vijfmaal hoger is dan die in het serum. Met de autoradiografie werd vastgesteld dat de cortex sector van de nier een hoger gehalte ampicilline bevat dan het gehalte in de medulla en de papilla. De onderlinge verhoudingen tussen de concentraties in deze sectoren bedroegen circa 2 voor cortex en medulla en circa 3,5 voor cortex en papilla. Met deze methode werd eveneens vastgesteld dat circa 50% van het ampicilline was omgezet tot bio-inactieve metabolieten. De analyse van de lymfe toonde aan dat in deze vloeistof een ampicilline concentratie aanwezig was die circa 93% van de concentratie in het serum bedroeg. Er vanuit gaande dat de ampicilline concentratie in de lymfe een weerspiegeling is van die in het weefsel moet geconcludeerd worden dat er een discrepantie aanwezig is tussen de uitkomsten van de drie methoden. Door te veronder-

stellen dat het ampicilline in de nier kan worden gebonden aan celbestanddelen is het mogelijk voor deze discrepantie een verklaring te geven. Immers, met de weefselhomogenaat-analyse en de autoradiografie wordt zowel vrij als gebonden ampicilline bepaald, terwijl in de lymfe alleen het vrije ampicilline wordt bepaald. Voor het bestaan van deze binding werd een tweetal aanwijzingen gevonden. Bij hoge infuus concentraties bleek een verzaadiging in de weefsel-concentratie op te treden en de halfwaarde tijd van ampicilline bleek in lymfe hoger te zijn dan in serum. De lagere klaring van het middel vanuit de lymfe suggereert de aanwezigheid van een diepgelegen reservoir compartiment.

Uit de resultaten van het onderzoek naar de verdeling van ampicilline in geïnfecteerde nieren met behulp van de homogenaat-analyse en de autoradiografie viel af te leiden, dat de ampicilline concentratie in het aangetaste weefsel lager was dan in het gezonde weefsel. Bij de analyse van de renale lymfe bleek dat de ampicilline concentratie in de lymfe niet werd beïnvloed door de aanwezigheid van de infectie. Door middel van kwantitatieve autoradiografie kon worden aangetoond dat de ampicilline concentratie in de infectiehaarden in de cortex van dezelfde orde van grootte was als in het serum.

In Hoofdstuk IV werd de ontwikkeling van het infectie- en therapiemodel beschreven. Inspuiting van de bacteriën via de huid in de nier veroorzaakte een locale infectie, waarbij de infectiehaarden zich voornamelijk in de cortex bevonden. Gevonden werd dat na de inspuiting het aantal bacteriën in de nier tijdelijk afneemt om vervolgens in enkele uren toe te nemen tot een niveau van circa 10^6 CFU/g nier. Dit niveau blijft gedurende de eerste 3 à 4 dagen van de infectie constant. Daarna neemt het aantal geleidelijk in de tijd af. Tengevolge van reflux uit de blaas werd de contra laterale nier in de meeste gevallen eveneens geïnfecteerd. Er bleek echter geen correlatie tussen de aantallen bacteriën in de geïnoculeerde nier, de contra-laterale nier en de blaas te bestaan.

Histologisch onderzoek toonde aan dat de infectie tot infiltraatvorming aanleiding geeft en dat er geen grote abscessen ontstaan, die de infectiehaard onbereikbaar zouden maken voor het antibioticum.

Het onderzoek naar de testcondities voor het therapiemodel leverde de volgende resultaten. Het bleek niet mogelijk met in de humane geneeskunde gangbare serumconcentraties de infectie binnen een werkbare behandelingsduur te genezen. Tevens bleek de spreiding in het aantal overlevende

bacteriën per nier sterk toe te nemen bij een behandeling die langer duurde dan 3 dagen. Naar aanleiding van deze en eerder vermelde resultaten werd besloten de behandeling 24 uur na het aanbrengen van de infectie te starten en deze gedurende 3 dagen voort te zetten. Een maat voor de werkzaamheid van de therapie bestond uit het verschil tussen het aantal bacteriën gekweekt uit de nier van behandelde en onbehandelde dieren. De serumconcentratie die na 3 dagen behandeling een reductie van 90% in het bacteriegetal teweeg bracht, werd als parameter voor de in-vivo gevoeligheid gekozen. Deze concentratie werd minimaal effectieve concentratie (MEC) genoemd.

De virulentie van de *E.coli* stammen werd bepaald met behulp van een in de literatuur beschreven niermodel bij de muis. Op basis van het verloop van het aantal bacteriën in de nier na een intraveneuze toediening werden de stammen ingedeeld in een drietal categorieën, namelijk virulent, nier-pathogeen en a-virulent. Een vergelijking van het gedrag van de bacteriën in de nier van de muis en van de rat toonde aan dat de onderlinge virulentie verschillen bij beide diersoorten redelijk overeenstemmen. Naast de indeling in virulentie groepen der *E.coli* stammen werd voor iedere stam een tweetal specifieke virulentie factoren bepaald, namelijk de productie van hemolysines en het hemagglutinatiëpatroon. Ook werd van de stammen het serotype bepaald. Uit een onderzoek naar een verband tussen deze factoren en het infectie-verloop in de nier van de rat bleek dat er alleen een correlatie bestond met de hemolysine productie.

De in-vivo gevoeligheid (MEC) bleek geen directe correlatie te vertonen met de virulentie-indeling van de *E.coli* stammen (Hoofdstuk V).

Voor de bepaling van de in-vitro gevoeligheid van de *E.coli* stammen voor ampicilline werd een drietal methoden toegepast: bepaling van de minimaal remmende concentratie (MRC), bepaling van de minimale antibioticum concentratie (MAC), en bepaling van de grensconcentraties die het vermogen tot vorming van kolonies beïnvloeden. De resultaten van dit onderzoek toonden aan dat de verschillende methoden weliswaar verschillende grensconcentraties opleveren, maar dat deze concentraties onderling redelijk tot zeer goed correleren. Een nader onderzoek van de MRC bepaling toonde aan dat de MRC concentratie afhankelijk is van het toegepaste inoculum. Verhoging van het inoculum leidde tot een verhoging van de MRC. Daarnaast bleek dat de verschillen in de MRC waarden, welke werden gevonden bij gebruik van verschillende media, het gevolg waren

pH verschillen in deze media.

Het onderzoek naar de afstervingsnelheid in vloeibaar medium van de bacteriën onder invloed van verschillende ampicilline concentraties leverde voor iedere stam een karakteristiek patroon van afstervingscurven. Uit het verloop van deze curven kon een wiskundige formule worden afgeleid waarmee de relatie tussen de ampicilline concentratie en het verloop van de ogenschijnlijke afstervingsnelheidsconstante (k_a) kon worden beschreven. Met behulp van deze formule kon voor iedere *E.coli* stam een viertal parameters: C_0 , α , k_0 en $k_a \text{ max}$ worden bepaald. Door α , k_0 en $k_a \text{ max}$ wordt de snelheid van het afstervingsproces bepaald, terwijl C_0 een minimale concentratie aangeeft waarbij het antibioticum de groei gaat beïnvloeden. Ofschoon C_0 op geheel andere wijze werd verkregen dan MRC en MAC vertoonden deze grootheden een redelijke correlatie (Hoofdstuk VI).

Een vergelijking tussen de in-vivo en in-vitro parameters van de *E.coli* stammen toonde aan dat er op basis van de thans voor handen zijnde gegevens betreffende de in-vitro gevoeligheid, de afsterving en de virulentie der stammen geen uitspraak gedaan kon worden over een verband tussen deze grootheden en de in-vivo gevoeligheid. Er bleek geen directe correlatie aanwezig te zijn tussen de MEC en de MRC, noch tussen de MEC enerzijds en de MRC en de afstervingsfactoren $f \alpha$ en $f k_a$ anderzijds. Gezien het bestaan van een significant verschil tussen de verdelingen van de ratio's $MRC/(MEC \times f \alpha \times f k_a)$ voor de a-virulente en virulente stammen is het waarschijnlijk dat de virulentie van een stam mede de MEC waarde bepaalt. Het feit dat er een opsplitsing in ten minste 2 groepen optreedt bij alle drie de virulentie-groepen, doet sterk vermoeden dat er één of meerdere tot nu toe onbekende factoren mede een belangrijke invloed hebben.

Opvallend bij de vergelijking tussen de MEC en de MRC was het feit, dat op één stam na, alle stammen een ratio MRC/MEC met een waarde groter dan 1 vertoonden. Met andere woorden de infectie reageerde op sub-MRC concentraties, de werking van deze sub-MRC concentratie op bacteriën werd besproken (Hoofdstuk VII).

Als slotconclusie van deze studie kan gesteld worden dat aanwijzingen zijn verkregen voor het veronderstellen van de aanwezigheid van een relatie tussen de in-vivo gevoeligheid en de in-vitro gevoeligheid, de afstervingsnelheid en de virulentie, maar dat het niet mogelijk is de

in-vivo gevoeligheid op basis van alleen deze gegevens te voorspellen.

SUMMARY

Antibiotics have proven their value for the treatment of bacterial infections in the past decades. For a successful treatment a certain concentration of an antibiotic has to be present at the site of infection during a specified period of time. The height of this antibiotic level depends on the in vivo susceptibility of the bacterial strain for this drug. Unlike this in vivo parameter the in vitro susceptibility can be estimated in the laboratory by a rather simple test. However there is little experimental knowledge about the relationship between the in vivo and in vitro susceptibility. The study described in this thesis is dealing with the following question: is it possible to predict on rational grounds the dosage of an antibiotic that is able to cure an infection of known localization by a bacterial strain of known in vitro susceptibility.

To this end the in vivo susceptibility for ampicillin of *E.coli* has been studied in an experimental pyelonephritis in the rat. Treatment was given by means of a continuous infusion. The use of a prolonged infusion period necessitated the development of a new infusion technique. For comparison of in vivo and in vitro results knowledge about the ampicillin concentrations in the rat kidney was indispensable. To estimate these concentrations three techniques have been used viz. analysis of tissue homogenates, analysis of renal lymph and autoradiography.

From the results of the infection model and the therapeutic model a parameter for the in vivo susceptibility was derived. The outcome of treatment of an infection not only depends on the effect of the antibiotic on the strain that causes the infection but also on the virulence of that strain. Therefore the virulence of the strains that were used was estimated by means of an experimental kidney infection in mice. Virulence of *E.coli* strains in mice has been compared with the behaviour

of these strains in the rat kidney and with the results of the in vivo susceptibility.

The results of in vitro susceptibility differ with the method used. To study this dependence susceptibility was tested by three different techniques. In addition the killing rate of the *E.coli* strains exposed to ampicillin has been studied. The in vitro results together with the virulence of the strains have been related to their in vivo susceptibility. Chapter I gives a description of the aim of this study and its experimental design.

As a consequence of the experimental design it was necessary to administer ampicillin by way of a continuous infusion over a period of 3 to 7 days. Because intravenous and intra-arterial infusion techniques did not function properly over such a long period, a new technique has been developed. It is described in Chapter II. Using a tissue cage as port of entrance for the antibiotic in the rat it was possible to maintain steady state conditions for at least 8 days. For proper functioning the tissue cage has to be constructed from rigid material and requires an encapsulation period of eight weeks after insertion. Advantages of this technique over intravenous infusions are (i) the possibility to apply very low infusion rates, (ii) the avoidance of problems with blood clotting or phlebitis and (iii) the fact that no special precautions are required if the infusion is interrupted. Finally the tissue cage appears to be well tolerated by the animal. On the other hand it must be remembered that the cage needs an encapsulation time of 8 weeks prior to its use.

The study of the intrarenal distribution of ampicillin in the rat kidney is described in Chapter III. In normal rats analysis of homogenates and autoradiography both showed a 5-times increased cortex concentration compared to the ampicillin concentration in serum. Autoradiography showed that the cortex concentration exceeded the concentration in the medulla and papilla section by a factor 2 and 3,5. It was also shown by this technique that about 50% of the ampicillin was changed into bio-inactive metabolites. From analysis of renal lymph it appeared, that the concentration of ampicillin in this fluid amounted to 93% of the concentration in serum. Assuming that the ampicillin concentration in lymph reflects the tissue concentration it is concluded that the results obtained with the three methods do not concur. The

hypothesis that ampicillin is bound to cortex tissue may hold the explanation why results obtained with these methods are discrepant. In this connection it is worth mentioning that during analysis of tissue homogenates and autoradiography both free and bound ampicillin is estimated. Whereas in lymph fluid only the level of free ampicillin is measured. Two indications were found for the existence of tissue binding. First, a high infusion concentration resulted in saturation of the tissue concentration. Second, the half life value of ampicillin that was found in lymph exceeded the value obtained in serum. The lower clearance of the drug from the renal lymph suggests the existence of a deep compartment in the tissue functioning as a reservoir.

In infected kidneys analyses of homogenates and autoradiography both showed a decrease in the ampicillin concentration in the cortex as compared to the normal rats. Ampicillin concentrations in lymph fluid were not influenced by the presence of an infection. From quantitative autoradiography it was concluded that the ampicillin concentration in the infection sites was of the same order as in serum.

In Chapter IV the infection model and therapeutic model is described. Direct inoculation of the right kidney of the rat results in a local infection. The infection sites are primarily situated in the cortex area. After inoculation the number of bacteria in the kidney temporarily decreases followed by an increase to the level of $\pm 10^6$ CFU/g kidney. This level is reached 18 hrs after inoculation and remains stable over the next 3 to 4 days. Thereafter the number of bacteria in the renal tissue slowly decreases. As a consequence of reflux from the bladder the contralateral kidney also becomes infected. However no correlation could be demonstrated between the number of bacteria isolated from the inoculated kidney, the contralateral kidney or the bladder.

Histologically the infection consisted primarily of cellular infiltrates without the formation of large abscesses. Therefore no compelling reason existed why the antibiotic should not be able to reach the infection sites.

A pilot study was performed to define test conditions of the therapeutic model. From this study it appeared that the kidney infection in the rat cannot be cured within a reasonable amount of time by serum levels that are considered to be satisfactory during treatment of patients. The same experiments also showed a sharp increase in the

fluctuations of the number of surviving bacteria in the kidney on the fifth day of the infection. As a result of these and other findings mentioned earlier it was decided to start treatment 24 hrs after inoculation and to continue infusion for 3 days. In order to measure the effect of therapy a comparison was made of the number of bacteria in treated and nontreated animals. The serum concentration leading to a 90% decrease in the number of bacteria after 3 days of treatment was chosen as parameter for the in vivo susceptibility. This concentration was defined as the minimal effective concentration (MEC).

The virulence of *E.coli* strains was estimated by means of an infection model described in literature (Chapter V). According to their behaviour in the mouse kidney after intravenous inoculation strains may be classified as virulent, nephropathogenic or avirulent. Comparison of the behaviour of the strains in the kidney of the rat and the mouse showed in both animals a similar virulence graduation between the strains. Apart from their classification according to virulence the strains were tested for their hemolysin production, for their hemagglutinating capacity and were serotyped. Comparison of these factors with the behaviour of the strains in the rat kidney only showed a correlation with hemolysin production.

The in vivo susceptibility (MEC) did not correlate directly with the virulence of the *E.coli* strains.

In Chapter VI a description is given of the in vitro experiments with *E.coli* and ampicillin. For estimation of the in vitro susceptibility three techniques have been used, viz. estimation of the minimal inhibitory concentration (MRC), estimation of the minimal antibiotic concentration (MAC) and estimation of the limiting concentrations (TB and TE) that influence the number of colonies formed on agar. Comparison of the three methods showed the existence of a reasonable to excellent correlation between the results obtained therewith. From a further study of the MRC estimation it appeared that the outcome of the test depends upon the density of the inoculum. Higher inocula lead to higher MRC values. The outcome of MRC values also depended on the pH-value of the growth medium.

The killing rate experiments showed that each *E.coli* reacted in its own characteristic way to the presence of various ampicillin concentrations. From the killing curves a mathematical formula could be derived that described the change in the apparent killing constant (k_a) with the

variation in the ampicillin concentration. By means of this formula the killing of each strain could be characterized by four parameters viz. C_0 , α , k_0 and $k_a \max$. Parameters α , k_0 and $k_a \max$ determine the killing rate, whereas C_0 determines the concentration at which ampicillin starts to influence the growth of the bacteria. Comparison of C_0 with MRC and MAC showed a fair degree of correlation between these concentrations.

The outcome of a comparison between the in vitro and in vivo results is given in Chapter VII. Prediction of in vivo susceptibility by means of data like in vitro susceptibility, the killing rate and the virulence of the strains is not possible. There is no direct correlation between MEC and MRC nor between MEC and on the other side MRC and killing rate factors α and $k_a \max$. However there exists a significant difference between the distribution of the ratio's $MRC / (MEC \times f \alpha \times f k_a)$ for the avirulent and virulent strains. This fact suggests that virulence is a factor that contributes to the in vivo susceptibility. All three virulence groups showed a distinct division into two subgroups in their ratio distributions suggesting that one (or more) unknown factor(s) influence the outcome of the experiments.

Comparison of MEC with MRC showed, for all strains except one, a ratio MRC/MEC with a value above 1. This result implies that the infection reacts positively on sub-MRC concentrations. The effects of sub-MRC concentrations on bacterial strains has been discussed.

As final conclusion from this study it can be stated that it is not possible to predict the in vivo susceptibility of *E.coli* strains for ampicillin by means of the in vitro susceptibility, the killing rate and the virulence of the strains. However indications have been found that these characteristics presumably influence the in vivo susceptibility.

LITTERATUUR

1. Neu HC. Current practices in antimicrobial dosing. *Rev Inf Dis* 1981; 3: 12-18.
2. Klastersky J, Daneau D, Swings G, Weerts D. Antibacterial activity in serum and urine as a therapeutic guide in bacterial infections. *J Inf Dis* 1974; 129: 187-193.
3. Graig WA, Welking PG. Protein binding of antimicrobials: clinical pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokin* 1977; 2: 252-268.
4. Cox CE, Beazley RM. Chronic venous catheterization: a technique for implanting and maintaining venous catheters in rats. *J Surg Res* 1975; 18: 607-610.
5. Sindram PJ, Snow GB, Van Putten LM. Intra-arterial infusion with methotrexate in the rat. *Br J Cancer* 1974; 30: 349-354.
6. Bennet JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WMM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 1966; 14: 170-173.
7. Guyton AC. A concept of negative interstitial pressure based on pressure in implanted perforated capsules. *Circulation Res* 1963; 12: 399-405.
8. Calnan J. A new method for the assesment of tissue fluid concentrations of flavinoids. *Angiologica* 1972; 9: 181-192.
9. Chisholm GD, Waterworth PM, Calnan J, Garrod LP. Concentration of antibacterial agents in interstitial fluid. *Br Med J* 1973; 1: 569-573.
10. Gong JK, DeLuca C. Infusion at constant rate in vivo. *Experienta* 1978; 34: 672-673.
11. Whelton A, Walker WG. An approach to the interpretation of drug concentrations in the kidney. *Johns Hopkins Med J* 1978; 142: 8-14.
12. Whelton A, Walker WG. Intrarenal antibiotic distribution in health and disease. *Kidney Int* 1974; 6: 131-137.
13. Katz YJ, Cockett ATK, Moore RS. Renal lymph and antibacterial levels in the treatment of pyelonephritis. *Life Sci* 1964; 3: 1249-1262.
14. Naber K, Madsen PO, Bichler KH, Sauerwein D. Nierengewebsspiegelbestimmung von antibiotika. *Infection* 1973; 4: 208-213.
15. Whelton A, Sapir DG, Carter GG, Kramer J, Walker WG. Intrarenal distribution of penicillin, cephalothin, ampicillin and oxytetracycline during varied states of hydration. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 179: 419-428.
16. Wunderlich P, Persson E, Schnermann J, Ulfendahl H, Wolgast M. Hydrostatic pressure in the subcapsular interstitial space of rat and dog kidneys. *Pfluegers Arch* 1971; 328: 307-319.
17. Wolgast M, Persson E, Schnermann J, Ulfendahl H, Wunderlich P. Colloid osmotic pressure of the subcapsular interstitial fluid of rat kidneys during hydropenia and volume expansion. *Pfluegers Arch*

- 1973; 340: 123-131.
18. Barza M, Bruschi J, Bergeron MG, Kemmotsu O, Weinstein L. Extraction of antibiotics from the circulation by liver and kidney: effect of probenecid. *J Infect Dis* 1975; 131: S 86 - S 97.
 19. Brogard JM, Pinget M, Meyer C, Dornier M, Lavillaureix J. Biliary excretion of ampicillin: experimental and clinical study. *Chemotherapy* 1977; 23: 213-226.
 20. Bruschi JL, Barza M, Brown RB, Bergeron MG, Weinstein L. Comparative pharmacokinetics of thirteen antibiotics in dogs. With especial reference to concentration in liver, kidney, bile and urine. *Infection* 1976; 4: S 82 - S 90.
 21. Luft FC, Kleit SA. Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J Infect Dis* 1974; 130: 656-659.
 22. Fabre J, Blanchard P, Rudhart M. Pharmacokinetics of ampicillin, cephalothin and doxycycline in various tissues of the rat. *Chemotherapy* 1977; 23: 129-141.
 23. Whelton A, Sapir DG, Carter GG, Garth MA, Walker WG. Intrarenal distribution of ampicillin in the normal and diseased human kidney. *J Infect Dis* 1972; 125: 466-470.
 24. Romas NA, Clark I. The distribution of tetracycline in renal tissue during pyelonephritis. *J Urol* 1969; 102: 541-546.
 25. Truss F, Nabert-Bock G. Penicillingewebsspiegel in entzündlich veränderten hydronephrosen. *Urologe (A)* 1971; 10: 21-25.
 26. Tsuchida S, Miyagawa I, Harada T, Kumagai I. Distribution of antibiotics in pyelonephritic kidneys of dogs. *Tohoku J Exp Med* 1978; 125: 317-323.
 27. Burrous SE, Cawein JB. Rat pyelonephritis model suitable for primary or secondary screening. *Appl Microbiol* 1969; 18: 448-449.
 28. Guze LB, Hubert EG, Kalmanson GM. Pyelonephritis. II. Observations on the treatment of enterococcal infection in the nonobstructed kidney of the rat. *J Lab Clin Med* 1963; 62: 90-102.
 29. Kaye D, Rocha H. Urinary concentrating ability in early experimental pyelonephritis. *J Clin Invest* 1970; 49: 1427-1437.
 30. Glauser MP, Lyons JM, Braude AI. Synergism of ampicillin and gentamicin against obstructive pyelonephritis due to *Escherichia coli* in rats. *J Infect Dis* 1979; 139: 133-140.
 31. Sack K, Marre R, Freiesleben H, Henkel W. Investigations on the effectiveness of cefazidime in experimental *E. coli* pyelonephritis. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1979; 29: 414-416.
 32. Van den Bosch JF. Virulence of *Escherichia coli* in urinary tract infection. *Dissertatie Vrije Universiteit Amsterdam*. Meppel: Krips Repro, 1981: 14-21.
 33. Dootson PH, MacLaren DM, Titcombe DHM. The distribution of urinary O-groups of *Escherichia coli* in urinary infections and in the normal faecal flora. In: Brumfitt W and Asscher AW, eds. *Urinary tract infection*. London: Oxford University Press, 1973: 139-145.
 34. Howard CJ, Glynn AA. The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K-antigens, to their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology* 1971; 20: 767-777.
 35. Fried FA, Vermeulen CW, Ginsburg MJ, Cone CM. Etiology of pyelonephritis: further evidence associating the production of experimental pyelonephritis with hemolysis in *Escherichia coli*. *J Urol* 1971; 106: 351-354.
 36. Svandborg-Edén C, Hanson LA, Jodal U, Lindberg U, Sohl-Akerlund A. Variable adherence to normal human urinary tract epithelial cells

- of *Escherichia coli* strains associated with various forms of urinary tract infection. *Lancet* 1976; ii: 490-492.
37. Guze LB, Montgomerie JZ, Potter CS, Kalmanson GM. Pyelonephritis XVI. Correlates of parasite virulence in acute ascending *Escherichia coli* pyelonephritis in mice undergoing diuresis. *Yale J Biol Med* 1973; 46: 203-211.
 38. Montgomerie JZ. Factors affecting virulence in *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect Dis* 1978; 137: 645-647.
 39. Van den Bosch JF, De Graaff J, MacLaren DM. Virulence of *Escherichia coli* in experimental hematogenous pyelonephritis in mice. *Infect Immun* 1979; 25: 68-74.
 40. Van den Bosch JF, Postma P, De Graaff J, MacLaren DM. Haemolysis by urinary *Escherichia coli* and virulence in mice. *J Med Microbiol* 1981; 14: 321-331.
 41. Van den Bosch JF, Verboom-Sohmer U, Postma P, De Graaff J, MacLaren DM. Mannose-sensitive and mannose-resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1980; 29: 226-233.
 42. Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1976; 13: 238-246.
 43. Easmon CSF. Experimental staphylococcal infection in mice. *J Med Microbiol* 1980; 13: 495-506.
 44. Arbuckle JBR. The location of *Escherichia coli* in the pig intestine. *J Med Microbiol* 1970; 3: 333-340.
 45. Fierer J, Talner L, Braude AI. Bacteremia in the pathogenesis of retrograde *E. coli* pyelonephritis in the rat. *Am J Pathol* 1971; 64: 443-455.
 46. Braude AI, Shapiro AP, Siemieniowski J. Hematogenous pyelonephritis in rats I. Its pathogenesis when produced by a simple new method. *J Clin Invest* 1955; 34: 1489-1497.
 47. Shimamura T, Cotton J, Wang JCW. Site of bacterial colonization in acute pyelonephritis induced in rats by *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 1978; 29: 253-259.
 48. Prát V, Losse H, Konicková L, Ritzerfeld W. Experimental ascending *Escherichia coli* pyelonephritis in the rat. *Invest Urol* 1970; 8: 311-318.
 49. Van den Bosch JF. Virulence of *Escherichia coli* in urinary tract infection. *Dissertatie Vrije Universiteit Amsterdam*. Meppel: Krips Repro, 1981: 98-101.
 50. Eudy WW, Burrous SE. Generation times of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* in experimental infections. *Chemotherapy* 1973; 19: 161-170.
 51. Brown MRW. Nutrient depletion and antibiotic susceptibility. *J Anti-microb Chemother* 1977; 3: 198-200.
 52. Lorian V, Popoola B. The effect of nitro-furantoin on the morphology of gram-negative bacilli. *J Infect Dis* 1972; 125: 187-189.
 53. Lorian V, De Freitas CC. Minimal antibiotic concentration of aminoglycosides and β -lactam antibiotics for some gram-negative bacilli and gram-positive cocci. *J Infect Dis* 1979; 139: 599-603.
 54. Rolinson GN. Subinhibitory concentrations of antibiotics. *J Anti-microb Chemother* 1977; 3: 111-113.
 55. Lorian V. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull NY Acad Med* 1975; 51: 1046-1055.
 56. Brown MRW, Garrett ER. Kinetics and mechanisms of action of anti-

- biotics on micro-organisms I. Reproducibility of *Escherichia coli* growth curves and dependence upon tetracycline concentration. *J Pharm Sci* 1964; 53: 179-183.
57. Rolinson GN, Macdonald AC, Wilson DA. Bactericidal action of β -lactam antibiotics on *Escherichia coli* with particular reference to ampicillin and amoxycillin. *J Antimicrob Chemother* 1977; 3: 541-553.
 58. Walter AM, Heilmeyer L. Ampicillin. In: Otten H, Plempel M und Siegenthaler W, eds. *Antibiotika Fibel*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1969: 198-204.
 59. Sherris JC, Rashad AL, Lighthart GA. Laboratory determination of antibiotic susceptibility to ampicillin and cephalothin. *Ann NY Acad Sci* 1967; 145: 248-265.
 60. Ezrow L, Saceanu C, Dabydeen H. Range of antibacterial activity of antibiotics at subminimal inhibitory concentrations: the ratio of minimal inhibitory concentration to minimal antibiotic concentration. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 821-824.
 61. Garrett ER, Chong Min Won. Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms XVII: Bactericidal effects of penicillin, kanamycin and rifampin with and without organism pretreatment with bacteriostatic chloramphenicol, tetracycline and novobiocin. *J Pharm Sci* 1973; 62: 1666-1673.
 62. Mattie H. A mathematical description of short-term effects of β -lactam antibiotics on bacterial growth in vitro. *Curr Microbiol* 1978; 1: 105-109.
 63. Elkhoully AE, Führer C. Kinetic studies of ampicillin action on *Escherichia coli* and their spheroplasts. *J Antibiot (Tokyo)* 1978; 31: 229-236.
 64. Scudamore RA, Beveridge TJ, Goldner M. Outer-membrane penetration barriers as components of intrinsic resistance to beta-lactam and other antibiotics in *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 15: 182-189.
 65. Spratt B. Distinct penicillin-binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 2999-3003.
 66. Shockmann GD, Daneo-Moore L, Cornett JB, Mychajlonka M. Does penicillin kill bacteria? *Rev Infect Dis* 1979; 1: 787-796.
 67. Stamey TA, Fair WR, Timothy MM, Miller MA, Mihara G, Lowery YC. Serum versus urinary antimicrobial concentrations in cure of urinary-tract infections. *N Engl J Med* 1974; 291: 1159-1163.
 68. Zimmermann KG, Siegenthaler W. Infektionen des Urogenitaltraktes. In: Otten H, Plempel M und Siegenthaler W, eds. *Antibiotika Fibel*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1975: 852-863.
 69. Naumann P. The value of antibiotic levels in tissue and in urine in the treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother* 1978; 4: 9-17.
 70. Eudy WW. Correlations between in vitro sensitivity testing and therapeutic response in urinary tract infections. *Urology* 1973; 11: 519-524.
 71. Burrous SE, Freedman R, Chamberlain RE, Basson RP. Pyelonephritis therapy in rats: random association with excreted urinary antibacterial activity. *Appl Microbiol* 1970; 20: 598-599.
 72. Mine Y, Nonoyama S, Kojo H, Fukada S, Nishida M, Nocardicin A, a new monocyclic β -lactam antibiotic. V In vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1977; 30: 932-937.
 73. Miller AK, Celozzi E, Pelak BA, Birnbaum J, Stapley EO. Correlation

- of in vitro susceptibility with in vivo efficacy in mice for cefoxitin in comparison with cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 569-579.
74. Merrikin D, Rolinson GN. Antibiotic levels in experimentally infected mice in relation to therapeutic effect and antibacterial activity in vitro. *J Antimicrob Chemother* 1979; 5: 423-429.
 75. Zak O, Kradolfer F. Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics in experimental infections. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 862-879.
 76. Comber KR, Osborne CD, Sutherland R. Comparative effects of amoxycillin and ampicillin in the treatment of experimental mouse infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7: 179-185.
 77. Nicas TI, Bryan LE. Relationship between susceptibility criteria and therapeutic serum levels for *Pseudomonas aeruginosa* in mouse infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 796-801.
 78. Davis SD. Dissociation between results of in vitro and in vivo antibiotic susceptibility tests for some strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5: 281-288.
 79. Dutcher BS, Reynard AM, Beck ME, Cunningham RK. Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 820-826.
 80. Lorian V, Atkinson BA. Effect of serum and blood on enterobacteriaceae grown in the presence of subminimal inhibitory concentrations of ampicillin and mecillinam. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 797-805.
 81. Nishida M, Mine Y, Nonoyama S, Yokota Y. Effect of antibiotics on the phagocytosis and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy* 1976; 22: 203-210.
 82. Nishida M, Mine Y, Nonoyama S, Kojo H. Nocardicin A, a new monocyclic β -lactam antibiotic. III In vitro evaluation. *J Antibiot (Tokyo)* 1977; 30: 917-925.
 83. Nishida M, Mine Y, Nonoyama S. Relationship between the effect of carbenicillin on the phagocytosis and killing of *Proteus mirabilis* by polymorphonuclear leukocytes and therapeutic efficacy. *J Antibiot (Tokyo)* 1978; 31: 719-724.
 84. Gemmel CG. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on experimental pyogenic infections in mice. *Curr Chemother* 1978; 1: 512-514.
 85. Lorian V, Atkinson BA. Comparison of the effects of mecillinam and 6-aminopenicillanic acid on *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1976; 11: 541-552.
 86. Lorian V, Sabath LD, Simionescu M. Decrease in ribosomal density of *Proteus mirabilis* exposed to subinhibitory concentrations of ampicillin or cephalothin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 149: 731-735.
 87. Svandborg-Edén C, Sandberg T, Stenqvist K, Ahlstedt S. Decrease in adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells in vitro by subinhibitory concentrations of ampicillin. *Infection* 1978; 6: S 121 - S 124.
 88. Comber KR, Boon RJ, Sutherland R. Comparative effects of amoxycillin and ampicillin on the morphology of *Escherichia coli* in vivo and correlation with activity. *Antimicrob Agents Chemother* 1977; 12: 736-744.
 89. Bryant RE, Hammond D. Interaction of purulent material with antibiotics used to treat pseudomonas infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6: 702-707.

90. Bakker-Woudenberg IAJM, Van Gerwen ALEM, Michel MF. Efficacy of antimicrobial therapy in experimental rat pneumonia: antibiotic treatment schedules in rats with impaired phagocytosis. *Infect Immun* 1979; 25: 376-387.

DANKWOORD

Mijn dank gaat uit naar een ieder die bij het tot stand komen van dit proefschrift betrokken is geweest.

Het feit dat niet allen bij naam genoemd worden, zal, naar ik mag hopen, niet geïnterpreteerd worden als een onderscheid mijnerzijds van de waardering van ieders bijdrage.

Prof.Dr.M.F.Michel. Voor de gelegenheid welke u mij bood voor het uitvoeren van het onderzoek en voor uw kritische begeleiding en medewerking betreffende het onderzoek en de hieruit voortvloeiende publicaties.

Prof.Dr.R.P.Mouton en Prof.Dr.I.L.Bonta. Voor de waardevolle suggesties welke u als coreferenten bij de beoordeling van het manuscript naar voren heeft gebracht.

G.G.Koejemans-Meiborg, A.V.de Lange-MacDaniël, C.J.Otte en P.van Fontijne. Gezina, Agnes, Kees en Peter, voor jullie toewijding en ondersteuning bij de uitvoering van het experimentele werk.

K.A.Moltzer, P.C.M.Koper, N.G.v.d.Wey. Karel, Peter en Nel, voor jullie bijdragen als keuze-practicanten.

H.v.d.Velden, M.van Vliet, Y.Elgersma-Huizer en W.J.Schneider. Harrie, Rinus, Yvonne en Wil, voor de technische assistentie, de verzorging der dieren en de bereiding van de media.

Dr.J.F.van den Bosch. Hans, voor je medewerking aan het onderzoek en voor de plezierige discussies hierover.

W.J.Kort. Wil, voor je bijdrage op micro-chirurgisch gebied.

W.C.J.Moolenaar. Wout, voor je medewerking bij het verwerken van de gegevens op de computer.

F.Schumacher. Frans, voor het boren van circa 20.000 gaatjes bij het vervaardigen van de weefsel-kamers en voor je medewerking bij het oplossen van technische problemen.

Dr.K.Comber. Keith, I am grateful for your assistance with the quantitative autoradiography and for the discussions that we had.

Dr.W.Hespe. Voor de medewerking bij het autoradiografie onderzoek.

J.J.Blankwater. Johan, voor je hulpvaardigheid en wijze lessen bij het vervaardigen van de autoradiogrammen.

Dr.F.C.de Vos. Frans, voor je steun en medewerking.

J.G.H.Fengler. Voor het vervaardigen van de foto's en het omslag.

M.A.H.Steinrötter. Marianne, voor je steun en toewijding bij het vervaardigen van het manuscript.

J.P.van de Merwe. Joop, voor de plezierige wijze waarop we vaak de resultaten bediscussieerden.

De afdeling Biostatistica, met name Drs.H.J.A.Schouten. Voor de waardevolle bijdragen op statistisch gebied.

De medewerkers van de 17e verdieping en van het bacteriologisch laboratorium A.Z.R. Voor de hulp bij het onderzoek en voor de plezierige werksfeer.

De medewerkers van C.R.W., C.P.B., A.V.C., Faculteitsbureau en de Centrale Diensten. Voor hun medewerking.

Gist-Brocades. Voor de gelegenheid het autoradiografie onderzoek uit te voeren.

Beecham Pharmaceuticals. Voor hun financiële, materiële en personele bijdragen aan het onderzoek.

Mijn moeder wil ik bedanken voor het feit dat zij mij in de gelegenheid heeft gesteld tot het volgen van een universitaire studie welke uiteindelijk uitmondde in dit wetenschappelijk verslag.

Tenslotte wil ik mijn vrouw en kinderen bedanken voor hun steun, medewerking en offers welke zij gaven bij het uitvoeren van het onderzoek en het tot stand komen van dit manuscript.

CURRICULUM VITAE

De auteur van dit proefschrift werd in 1946 geboren te 's Gravenhage. Nadat hij in 1964 het HBS-B diploma behaalde aan het Johan de Witt Lyceum te Scheveningen, begon hij met de studie voor scheikundig ingenieur aan de Technische Hogeschool te Delft. In januari 1972 werd het doctoraal examen afgelegd in de biologisch-chemische richting. Tijdens de hierna volgende militaire dienstdienst, was hij gedetacheerd op het Medisch Biologisch Laboratorium, waar hij ook nadien voor een korte periode bleef werken. Sedert 1974 was hij werkzaam op de Medische Faculteit van de Erasmus Universiteit Rotterdam. Na enkele maanden verbonden te zijn geweest aan het Faculteitsbureau, werd aangevangen met het hier beschreven onderzoek dat verricht werd op het instituut Klinische Microbiologie en Antimicrobiële Therapie. Gedurende het eerste jaar was hij in dienst van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam en nadien bij de Erasmus Universiteit Rotterdam. Sedert maart 1979 was hij gedeeltelijk werkzaam op eerder genoemd instituut en het Faculteitsbureau, waar hij met ingang van augustus 1980 volledig in dienst trad als beleidsmedewerker.